MANUEL TECHNIQUE DE MICROBIOLOGIE ET SÉROLOGIE

~~Bact. Lab~~

MICROBIOLOGIE

ET

SÉROLOGIE

MANUEL TECHNIQUE

DE

MICROBIOLOGIE ET SÉROLOGIE

PAR

LE PROFESSEUR A. CALMETTE
S.-Directeur de l'Institut Pasteur,

L. NÈGRE ET A. BOQUET
Chefs de Laboratoire à l'Institut Pasteur.

MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120, PARIS
1925


WELLCOME
HISTORICAL
MEDICAL
LIBRARY

PRÉFACE

Nous avons appris, par notre expérience personnelle, combien les microbiologistes et les sérologistes, surtout quand ils sont livrés à eux-mêmes et qu'ils ont la responsabilité de diriger un laboratoire, éprouvent de difficultés à trouver, au moment où ils en ont besoin, la description de telle méthode de recherches, de tel procédé technique ou de tel dispositif d'expériences qu'ils se rappellent imparfaitement. Les mieux doués et les plus instruits savent bien qu'il est prudent de ne pas toujours s'en rapporter à leur mémoire, si fidèle qu'elle puisse être. Il peut donc leur être commode d'avoir, sur leur table de travail, un livre tel que celui que nous leur offrons, qu'ils puissent feuilleter ou consulter à leur gré.

Ce « Manuel » n'est ni un traité, *ni un* cours *de microbiologie. Il n'a la prétention de rien enseigner. Il ne s'adresse pas aux microbiologistes débutants, mais seulement à ceux qui ont déjà quelque habitude des manipulations de laboratoire.*

Nous l'avons d'abord composé pour nous-mêmes, et si nous nous décidons à le publier, c'est parce que plusieurs de nos collègues et de nos élèves, auxquels nous avions prêté nos notes, ont fini par nous convaincre qu'il pourrait rendre service à beaucoup d'autres.

Professeur A. Calmette,
A. Boquet, L. Nègre.
(Institut Pasteur, octobre 1924.)

Table des matières v. p. 566

MANUEL TECHNIQUE

DE

MICROBIOLOGIE ET SÉROLOGIE

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUES GÉNÉRALES DU LABORATOIRE

CHAPITRE PREMIER

MICROSCOPE ET ULTRA-MICROSCOPE

Microscope.

Le microscope se compose d'un *statif* et d'une *partie optique.*

Pour un laboratoire de bactériologie, le microscope doit comprendre, sur le statif, une platine mobile, avec ou sans chariot, un condensateur Abbé avec diaphragme iris et un miroir.

On fixe la préparation sur la platine du microscope à l'aide des valets. Ceux-ci sont constitués par deux petites lames flexibles implantées à angle droit sur une tige rigide qui s'enfonce dans un trou creusé dans la platine. Un ressort à boudin, enroulé autour de la tige et s'appuyant sur la platine, maintient la lame flexible.

La platine mobile permet de centrer exactement les pré-

parations, mais elle n'a pas un déplacement assez étendu pour qu'on puisse examiner toute leur surface. Avec une certaine habitude, en saisissant la lame entre le pouce et l'index de la main gauche, on peut, en ôtant les valets, la déplacer à son gré sur la platine.

Quand on veut faire des examens systématiques, on se sert d'une platine à chariot. La préparation, fixée sur le cha-

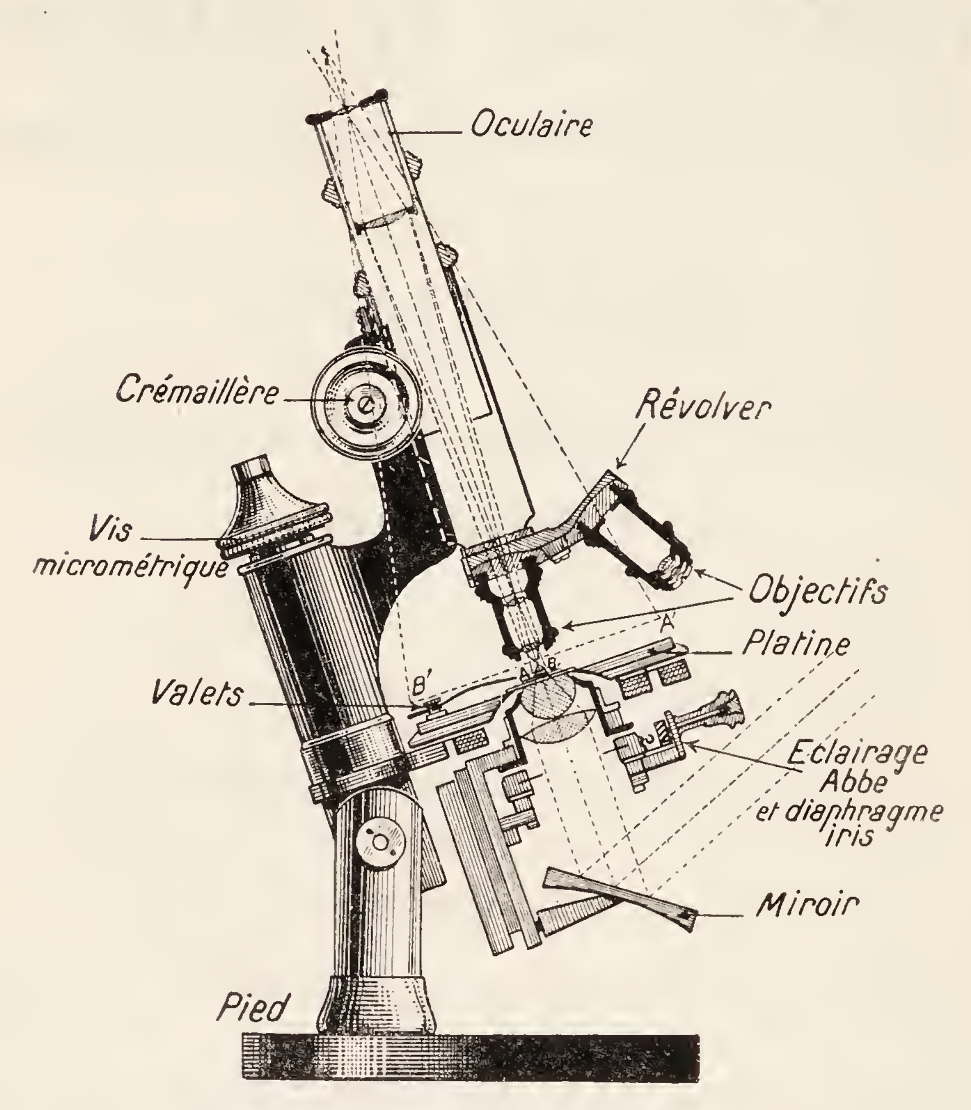


Fig. 1. — Marche des rayons lumineux dans un microscope.

riot, peut être promenée en tous sens, grâce à un mouvement antéro-postérieur et à un mouvement latéral, commandés par deux vis.

Le *condensateur Abbé*, constitué par deux ou trois lentilles, reçoit les rayons lumineux envoyés par le miroir et augmente leur puissance en les condensant sur la préparation.

Le *diaphragme iris* permet d'élargir ou de rétrécir, à

volonté, le diamètre du cône éclairant. Il sert surtout dans les examens à l'état frais.

Le *miroir* a deux faces, l'une plane et l'autre concave.

La partie optique se compose des *objectifs* et des *oculaires.*

Les *objectifs à sec* sont employés pour les grossissements modérés. Les constructeurs français les désignent par les chiffres 0, 1, 2, 3, etc., jusqu'à 9, par ordre de grossissement croissant.

Pour les grossissements plus forts, on se sert des *objectifs à immersion homogène* qui ne peuvent être utilisés qu'en interposant, entre la préparation et l'objectif, un liquide, l'huile de cèdre, dont l'indice de réfraction est sensiblement le même que celui du verre de l'objectif. On évite ainsi la perte des rayons lumineux qui se produit par la réfraction dans l'air.

Les objectifs à sec ou à immersion actuellement employés sont dits *achromatiques* parce qu'ils sont construits pour éviter la dispersion des couleurs fondamentales du spectre. La correction est encore plus complète avec les objectifs dits *apochromatiques*, mais leur prix est très élevé.

Les objectifs se fixent sur un revolver. Les revolvers à trois objectifs sont très suffisants dans la pratique courante.

On peut avoir deux objectifs à sec (un n° 4 et un n° 6 ou 7) et un objectif à immersion (1/12 ou 1/15).

Les oculaires de Huyghens sont numérotés en chiffres romains de I à III. On les emploie avec les objectifs achromatiques à sec.

Les oculaires compensateurs sont fabriqués spécialement pour corriger l'inégalité de grossissement pour les différentes couleurs et ne conviennent théoriquement qu'aux objectifs à immersion (Langeron). Ces oculaires portent des chiffres, 2, 4, 6, 8, 12, qui indiquent leur grossissement propre. Ils sont capables de grossir autant de fois l'image donnée par l'objectif.

Les oculaires 4, 6 et 9 sont les plus employés.

Pour chaque objectif, la valeur du grossissement, avec toute la série des oculaires, calculée pour un écartement des deux systèmes de 160 millimètres, est indiquée par chaque fabricant.

Mensuration des microbes. — Les dimensions des microbes sont exprimées en millièmes de millimètre par la lettre grecque μ (mu).

Pour les mesurer, on se sert d'un oculaire micrométrique et d'un micromètre objectif.

L'oculaire micrométrique porte, entre ses deux lentilles, un verre sur lequel est gravée une échelle graduée en dixièmes de millimètre.

Le micromètre objectif est une lame de verre portant une série rectiligne de traits espacés d'un centième de millimètre.

La mensuration se fait de la façon suivante :

On commence par placer le micromètre objectif sur la platine et l'oculaire micrométrique à la place des oculaires. On fait tourner l'oculaire de façon à rendre parallèles les deux échelles graduées et on superpose les deux zéros en déplaçant le micromètre objectif. Puis, en suivant des yeux les deux échelles à partir du zéro, on note les deux premiers traits qui se confondent.

Si, par exemple, le trait 10 du micromètre oculaire tombe sur le trait 4 de l'objectif micrométrique, 10 divisions oculaires représentent, sur la préparation, 4 fois 1/100 de millimètre ; une division oculaire représentera

$$\frac{0 \text{ mm. } 04}{10} : 0 \text{ mm. } 004 = 4\,\mu$$

On enlève alors l'objectif micrométrique et on le remplace par la préparation portant les microbes à mesurer.

Si la longueur d'un microbe correspond à N divisions de l'oculaire, sa longueur sera $N \times 4\,\mu$.

Si $N = 2$, la longueur du microbe sera de $8\,\mu$.

Entretien du microscope. — Le microscope demande à être entretenu avec beaucoup de soin.

Il doit être mis à l'abri des poussières et de l'humidité en le replaçant, après chaque examen, dans sa boîte. On peut aussi le recouvrir d'un linge fin et le mettre sous une grande cloche de verre.

Les objectifs à sec sont essuyés avec un papier de soie ou une peau de chamois.

Après chaque examen, l'huile de cèdre doit être enlevée

de l'objectif à immersion avec un papier de soie ou un linge fin. Si l'huile s'est desséchée sur l'objectif, on nettoie ce dernier avec du papier de soie ou un linge fin imbibé légèrement de xylol, puis on l'essuie avec un papier ou un linge sec.

Le xylol ne doit pas être mis en excès, car il pourrait dissoudre le ciment qui fixe les lentilles. Pour la même raison. ne pas laisser tremper l'objectif à immersion dans l'huile de cèdre déposée sur la préparation.

Les oculaires sont essuyés de temps en temps avec un papier de soie ou un linge fin sec. Si les grains de poussière persistent, malgré un nettoyage extérieur, dévisser les lentilles, nettoyer leurs faces intérieures et les remettre en place.

Le condensateur, le miroir, la platine, sont entretenus en les essuyant, de temps en temps, avec un linge fin sec ou avec la peau de chamois.

Si de l'huile de cèdre s'est répandue sur la platine, frotter celle-ci avec un papier imbibé de xylol, puis l'essuyer avec un papier ou un linge sec.

Il est bon de lubréfier de temps en temps les organes de glissement avec un peu d'huile de vaseline.

Ultra-microscope.

Le principe de l'ultra-microscope est basé sur le phénomène de Tyndall : les poussières en suspension dans l'air d'une chambre, qui sont en général invisibles, deviennent visibles lorsque, les fenêtres étant closes, un rayon de soleil filtre par une fente et vient se réfléchir sur les grains de poussière qui s'illuminent.

Alors que, dans un microscope ordinaire, « les rayons lumineux pénètrent directement dans l'appareil après avoir traversé l'objet qui agit sur eux par absorption, réfraction et diffraction, dans les appareils à fond noir *aucun rayon lumineux ne pénètre directement dans le microscope* ; ils y pénètrent *indirectement* après avoir été réfléchis, réfractés ou diffractés par l'objet » (Langeron).

Comme les grains de poussière s'illuminent dans la pièce obscure, les microbes, éclairés latéralement, apparaissent lumineux sur un fond noir.

Tous les grands fabricants d'appareils optiques construisent des ultra-microscopes. Nous ne parlerons que de celui de Stiassnie, très simple et très répandu en France.

L'examen à l'ultra-microscope nécessite, en dehors de l'appareil lui-même, un petit diaphragme conique qui s'adapte à l'objectif à immersion, et une source lumineuse spé-

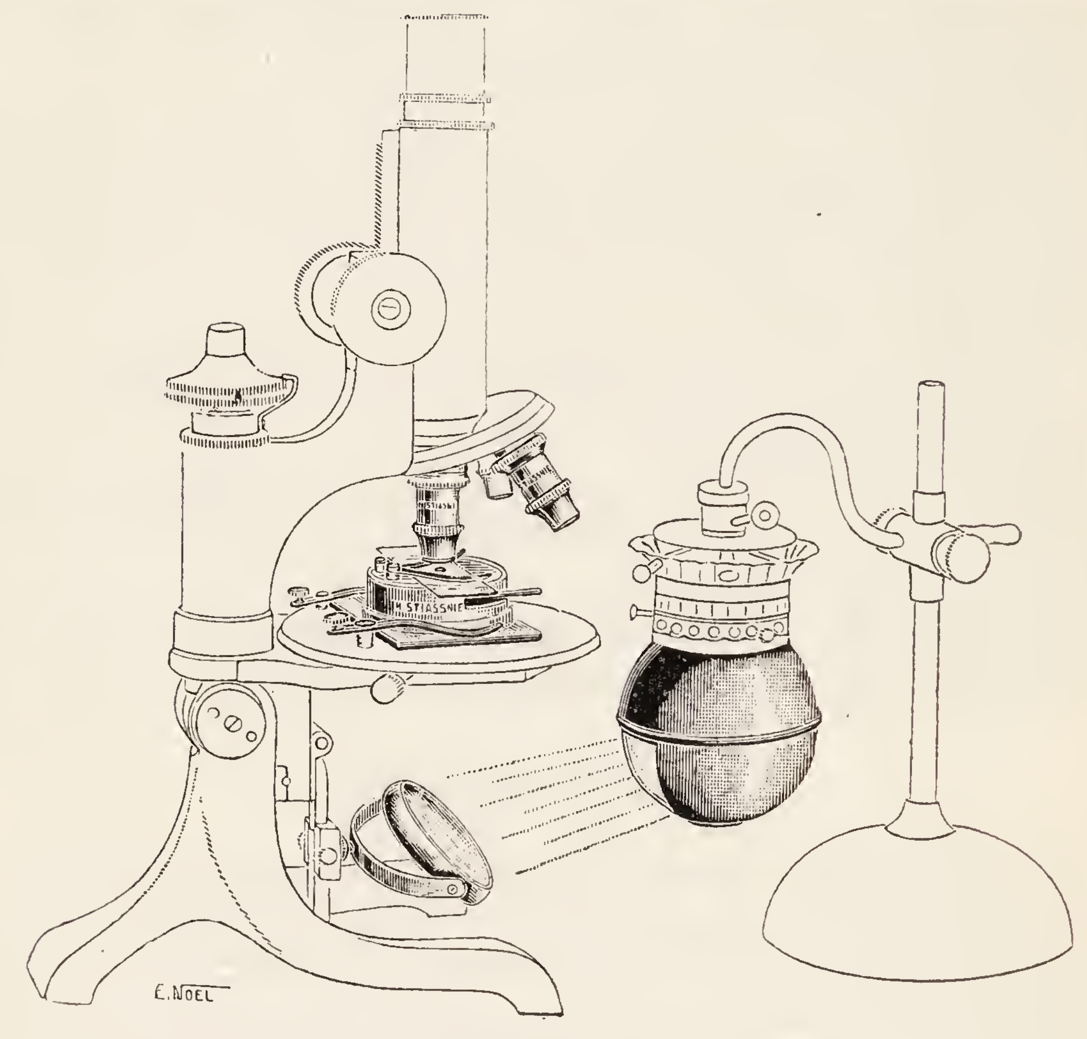


Fig. 2. — Ultra-microscope de Stiassnie.

ciale (bec Auer, lampe à acétylène ou lampe électrique à verre dépoli).

On doit, autant que possible, pratiquer les examens dans une pièce obscure.

Pour opérer un examen ultra-microscopique, on dépose, sur une lame très propre, une goutte d'eau contenant les microbes et on la recouvre d'une lamelle.

La propreté des lames et des lamelles, leur épaisseur ainsi que celle de la couche de liquide, sont autant de facteurs qui ont leur importance.

Pour se servir de l'appareil, on doit retirer le condensateur Abbé du microscope et placer l'ultra-microscope sur la platine du microscope en le fixant avec les valets.

On place le microscope à 25 centimètres environ du foyer lumineux quand on interpose une lentille condensatrice entre la source de lumière et le miroir, et à 15 ou 20 centimètres quand il n'y a pas de lentille. On déplace alors le miroir jusqu'à ce qu'on ait obtenu le maximum d'intensité lumineuse.

Dans la cavité supérieure de la lentille de l'ultra-microscope, on verse un peu d'huile de cèdre. On pose, sur l'appareil, la lame qui a été préparée et on la fixe avec les valets. L'huile de cèdre de la cavité doit venir en contact avec la partie inférieure de la lame. Avoir bien soin qu'aucune bulle d'air ne reste entre la lame et l'huile de cèdre de la cavité.

Avant de procéder à l'examen, on centre la lentille de l'ultra-microscope avec un objectif faible. On fait coïncider le cercle qui est au centre de l'appareil avec le centre du champ.

On peut alors déposer une goutte d'huile de cèdre sur la lamelle et examiner avec l'objectif à immersion.

CHAPITRE II

STÉRILISATION — FILTRATION

Les instruments, la verrerie, les milieux de culture qui sont employés dans les recherches bactériologiques doivent être *parfaitement stériles*. Tous les germes sont détruits par une température de 115°-120° (chaleur humide) ; de 180° (chaleur sèche).

Les méthodes de stérilisation par les agents physiques peuvent être rangées dans l'un des groupes suivants :

1° Chaleur sèche ;
2° Chaleur humide ;
3° Filtration.

I. Stérilisation par la chaleur sèche.

A. ***Stérilisation dans la flamme***. — Employée pour les petits instruments en verre ou en métal. On se contente de les passer plusieurs fois dans la flamme d'un bec Bunsen. d'une lampe à alcool ou d'un brûleur à pétrole. On les laisse ensuite refroidir, en évitant qu'ils soient souillés par le contact des objets voisins.

B. ***Stérilisation par le four à flamber***. — Le four à flamber n'est utilisé que pour stériliser la verrerie. Les extrémités des objets qui portent de l'ouate ou du papier doivent être tournées vers le haut. Il faut éviter leur contact avec le fond ou les parois de l'appareil qui sont toujours beaucoup plus chauds. Eviter aussi que les becs brûlent en dedans. On en sera averti par une petite explosion qui se produit au moment de l'allumage, par la blancheur de la flamme, par un bruit spécial et par l'odeur qui se répand.

Chauffer jusqu'à 180°. Eteindre une demi-heure après que cette température a été atteinte.

Laisser refroidir, puis ouvrir le four et attendre quelque temps avant d'enlever les objets, pour éviter que la verrerie se brise.

Le flambage a été réussi si le coton et le papier ont pris une teinte jaune clair. S'ils sont restés incolores, la température n'a pas été suffisante. S'ils sont noircis, elle a été trop élevée.

II. Stérilisation par la chaleur humide.

A. ***Au-dessous de 100°.*** — Stérilisation par chauffage discontinu ou tyndallisation. Employée pour les liquides tels que le sérum, l'ascite, etc., qui sont modifiés par un chauffage au-dessus de 60°. On les chauffe dans un bain-marie réglé à 56-58°, pendant une heure, trois jours de suite.

B. ***A 100°.*** — La vapeur d'eau à 100° ne permet pas une stérilisation complète en une seule opération. Il faut répéter le chauffage trois jours de suite chaque fois pendant 45 minutes à 1 heure.

C. ***A 110°, 115°, 120° par vapeur d'eau sous pression dans l'autoclave de Chamberland.*** — Verser de l'eau dans la chaudière. En plaçant le couvercle, vérifier si le joint en caoutchouc est en place et ne pas trop serrer les boulons. Allumer en observant les précautions indiquées pour le four à flamber. Ne fermer le robinet de vapeur que lorsque la vapeur s'échappe en jet continu. A ce moment seulement l'appareil est entièrement purgé d'air. Lorsque la stérilisation est terminée (20 à 30 minutes de chauffage à 115° ou à 120°), ne pas ouvrir le robinet de vapeur et ne pas desserrer les boulons avant que l'aiguille du manomètre soit revenue à 0. Si on ouvre plus tôt l'autoclave, la brusque décompression des liquides provoque, par leur ébullition, la souillure et la projection des cotons.

La température atteinte dans la stérilisation peut être contrôlée par l'emploi d'indicateurs. Ceux-ci, contenus dans des petites ampoules scellées, sont placés dans les liquides à stériliser. Le soufre en poudre avec traces de

fuchsine fond à 115° et se colore en rouge. L'antipyrine avec traces de bleu de méthylène fond vers 120° et se colore en bleu.

III. Stérilisation par filtration sur bougies poreuses.

Les bougies filtrantes qui sont employées pour la stérilisation des eaux destinées à l'alimentation servent, dans les laboratoires de bactériologie, à séparer, des corps microbiens, les toxines produites par la culture des microbes en milieu liquide (toxine diphtérique, toxine tétanique) ou à stériliser les milieux de culture qui pourraient être altérés par la chaleur.

Les bougies Chamberland sont de deux types : 1° les grosses bougies marquées F ou B. Ces dernières sont moins perméables que les précédentes. La marque F sert à filtrer les cultures microbiennes pour en séparer les toxines ; 2° les bougies de laboratoire sans embase, numérotées L_1, L_1 *bis*, L_2, L_3, L_4, L_5, etc... L_5 correspond, comme porosité, à la grande bougie F ; L_1 égale celle de B. Les bougies marquées L_1 et L_2 sont les plus perméables. On peut s'en servir pour la filtration des solutions diastasifères telles que les liquides de macération de cultures d'*Aspergillus niger*. Toutefois, il faut savoir que beaucoup de diastases sont partiellement retenues par la porcelaine poreuse, surtout lorsqu'elles sont en solutions acides. Il faut donc toujours neutraliser les liquides avant la filtration.

Les bougies, de L_1 à L_3, sont traversées par les microbes dits *virus filtrants*.

La filtration peut s'opérer par *pression* ou par *aspiration*. Dans le premier cas, on se sert de la bougie Chamberland B ; dans le second de la bougie F.

D'autres filtres que les bougies Chamberland peuvent être utilisés, telles les bougies en terre d'infusoires (bougies Berkefeld) et les bougies d'amiante qui sont très perméables, mais offrent moins de sécurité parce qu'elles présentent plus souvent des fissures.

Avant leur emploi, les bougies seront éprouvées avec soin. Les immerger dans une éprouvette remplie d'eau et y insuffler de l'air au moyen d'une poire en caoutchouc. Si

des bulles d'air, partant d'un même point, s'échappent dans l'eau, la bougie est fissurée et doit être rejetée.

Dans la filtration, l'emploi des tests microbiens permettra de déceler la même cause d'erreur. On emploie généralement comme test le microbe du *Choléra des poules* qui est très petit et rapidement cultivable.

La filtration ne doit pas être de trop longue durée et la pression atteinte doit toujours être notée.

Nettoyage, régénération et stérilisation des bougies Chamberland.

La calcination des bougies doit être évitée, car elle provoque la formation de sédiments adhérents, qui colorent les bougies, les fendillent et diminuent leur porosité.

Il faut, après usage, les tremper dans un récipient en verre rempli d'eau chaude additionnée de 1 à 2 p. 100 de chlorure de chaux en poudre.

Ce bain a pour effet de gonfler et de ramollir le dépôt superficiel. On passe ensuite les bougies sous un filet d'eau en les brossant avec une brosse en crin, puis on les plonge dans un bain d'eau froide contenant 1.000 à 1.500 grammes de chlorure de chaux pour 10 litres d'eau. On les laisse ainsi immergées pendant 30 minutes. Le chlore détruit les matières organiques à l'intérieur des pores.

Ensuite on rince de nouveau sous le robinet et on plonge les bougies dans un autre bain d'eau froide contenant 1.000 à 1.500 grammes d'acide chlorhydrique dans 10 litres d'eau. On les y laisse pendant 30 minutes. Les sédiments extérieurs et le calcaire sont ainsi solubilisés.

Il ne reste plus qu'à rincer une dernière fois fortement sous le robinet et à laisser tremper les bougies dans de l'eau distillée qu'on change plusieurs fois jusqu'à ce qu'elle ne fournisse plus aucune réaction acide au tournesol.

Si les bougies sont colorées, on peut les plonger dans un bain concentré de bisulfite de soude avant le dernier lavage. Lorsqu'elles sont bien propres, on les laisse sécher à l'air et on les conserve dans de larges flacons bouchés à l'émeri ou au liège.

On stérilise les bougies en les plaçant une à une dans un

gros tube à essai au fond duquel on a versé quelques gouttes d'eau et qu'on bouche à l'ouate. On les porte alors à l'autoclave et on chauffe à 115° pendant 20 minutes. Les bougies stériles peuvent ensuite rester dans le tube qui les renferme, jusqu'au moment où l'on doit les employer.

CHAPITRE III

ISOLEMENT ET PURIFICATION DES MICROBES — CONSERVATION DES SOUCHES MICROBIENNES

A. ***Isolement à l'aide de milieux solides. — Séparation par dilution et ensemencement en plaques de gélatine ou de gélose.*** — Lorsqu'on se propose d'isoler les germes d'une culture en milieu liquide, d'abondance moyenne, ou d'un pus assez riche en microbes, on prélève une anse d'environ un millimètre de diamètre de ces produits et on la dilue dans 10 centimètres cubes d'eau physiologique. Après agitation, une goutte de cette dilution est portée, à l'aide d'une pipette Pasteur, dans un tube de gélatine fondue. Bien mélanger en inclinant, puis en redressant brusquement le tube et en le tournant entre les deux mains. Faire un prélèvement dans ce premier tube de gélatine avec une nouvelle pipette et porter trois gouttes dans un second tube. Après brassage, prendre avec une autre pipette quelques gouttes dans ce dernier tube et en déposer six dans un troisième tube de gélatine.

Chacun des tubes de gélatine est alors coulé dans une boîte de Pétri stérile. Pour cela, enlever le coton du tube à essai, et flamber rapidement l'orifice, soulever le couvercle de la boîte et y verser la gélatine en ayant soin de la répartir sur toute la surface. Poser ensuite les boîtes horizontalement sur une table froide, puis, quand la gélatine a fait prise, les porter à l'étuve à 22°.

Au lieu de gélatine, on peut se servir de gélose. Il est alors nécessaire de maintenir les tubes qui contiennent la gélose fondue à une température de 40°, pour éviter qu'elle fasse prise avant la coulée dans les boîtes de Petri. Celles-ci seront placées à l'étuve à 37° après avoir été retournées, afin que l'eau de condensation ne souille les cultures.

Lorsqu'on veut procéder à la séparation de microbes qui

ont poussé sur milieu solide, il faut émulsionner la culture dans de l'eau stérilisée, puis on procède comme nous venons de l'indiquer.

Séparation par épuisement sur milieux solides (gélose, sérum).

Procédé de Roux et Yersin. — La semence est étalée à la surface de 3 ou 4 tubes de gélose inclinée ou de sérum, à l'aide d'un fil de platine ou d'une spatule, sans les recharger. Eviter de toucher l'eau de condensation. La semence s'épuise peu à peu et, dans les derniers tubes ensemencés, le nombre des colonies est peu élevé. Cette méthode est très pratique dans le cas où la semence n'est pas très riche en germes ou lorsqu'on se sert d'un milieu électif, comme le sérum pour le bacille diphtérique.

Au lieu de tubes de gélose ou de sérum inclinés, la séparation par épuisement peut être faite en tubes à faces plates de Legroux ou en boîtes de Roux remplis des mêmes milieux préalablement coagulés. Dans ce cas, l'ensemencement doit être fait avec une pipette coudée qu'on essuiera sur le milieu sur toute sa longueur, ou avec un petit rouleau qui sera préparé de la façon suivante :

On plie par le milieu, à angle aigu, un fil d'aluminium, de fer ou de cuivre, de 10 à 15 centimètres de long et de 2 millimètres de diamètre environ ; on fait ensuite un coude à 10 ou 15 millimètres de chacune des extrémités et on introduit un tube de verre de 2 centimètres de long sur 5 millimètres de diamètre (tubes dont on fait les pipettes Pasteur) à extrémités mousses, entre les branches pliées. Le tube roule doucement sur la surface de la gélatine sans l'égratigner.

Procédé de Veillon. — Epuiser successivement la semence dans l'eau de condensation de plusieurs tubes de gélose ou de sérum. Incliner ensuite ces tubes pour que l'eau de condensation vienne les ensemencer.

B. ***Isolement par ensemencement sur milieux électifs.*** — *Exemple* : Ensemencement sur sérum coagulé pour le bacille diphtérique, sur milieu de Dieudonné pour le vibrion cholérique.

C. ***Isolement par divers moyens***. — Chauffage à 90°, 100°. Seuls les microbes sporulés résistent.

Inoculation à un animal sensible (*Exemple* : souris pour le pneumocoque, cobaye pour le bacille tuberculeux).

D. ***Isolement des anaérobies*** (voir chapitre XL). — Le procédé le plus employé, à cause de sa simplicité, est celui de Veillon. Il faut se servir de tubes à essai de grande taille : 22 centimètres de long sur 15 millimètres de diamètre. Ils sont remplis, sur une hauteur de 10 centimètres environ, avec une gélose transparente, à 1 ou 2 p. 100, à laquelle on ajoute 1, 5 p. 100 de glucose. On fait fondre une dizaine de tubes en les plaçant dans de l'eau qu'on porte à l'ébullition pendant 10 minutes (de façon à bien chasser l'air). Ils sont ensuite refroidis au bain-marie à 40°.

A l'aide d'une pipette stérilisée, verser une goutte de semence dans un premier tube ; après avoir agité, prélever avec une nouvelle pipette une goutte de gélose ensemencée qu'on porte dans un second tube, et ainsi de suite jusqu'à la fin de la série.

On peut aussi, avec un fil de platine, ou avec une pipette effilée, non ouverte, toucher la semence et les laver successivement dans les tubes sans les recharger.

Lorsque l'ensemencement est terminé, les tubes sont plongés dans l'eau froide, puis portés à l'étuve à 37°.

Les tubes de culture sont examinés tous les jours pendant un temps prolongé, certains anaérobies ne poussant qu'au bout de 8 à 10 jours.

Les colonies d'anaérobies s'arrêtent à 1 centimètre de la surface, car la partie supérieure de la gélose a dissous de l'air pendant le refroidissement.

Si le pus ensemencé contient des anaérobies facultatifs ou des aérobies stricts, on peut trouver des colonies dans la zone aérée.

On prélève les colonies au moyen d'une pipette effilée et stérilisée qui joue le rôle d'emporte-pièce. Pour les repiquer, il suffit de souffler la colonie qui a été ainsi emportée dans un tube de gélose glucosée. Le prélèvement est facilité en adaptant, à la partie supérieure de la pipette, un tube de caoutchouc souple de 0 m. 40 de longueur, dont l'extrémité libre, munie d'un embout, est reçue dans la bouche.

Lorsque le produit à ensemencer contient des formes sporulées, on peut, comme pour les aérobies, les séparer au moyen de la chaleur.

L'inoculation aux animaux sensibles (cobayes) s'emploie spécialement pour l'isolement du bacille tétanique.

E. ***Purification des colonies isolées.*** — Il est rare qu'à la première séparation une colonie isolée soit pure. Les microbes d'impureté sont généralement masqués par le développement rapide du microbe principal. Dans les repiquages ultérieurs, quand les tubes sont conservés un certain temps, ces microbes peuvent prendre le dessus.

Il est donc prudent de faire, à deux ou trois reprises, de nouvelles séparations par épuisement sur tubes de gélose inclinée, ou par dilution et ensemencement sur plaques de gélose.

Pour les anaérobies, faire une nouvelle séparation en tubes de gélose glucosée, comme il a été indiqué.

F. ***Conservation des souches microbiennes.*** — *Conservation des cultures vivantes.*

Les cultures de microbes conservent généralement assez longtemps leur vitalité et leur virulence lorsqu'on les maintient à l'obscurité, à basse température et en tubes scellés, à l'abri de l'air. Toutefois les conditions de conservation sont très variables suivant les espèces. Certaines cultures en milieux liquides doivent être maintenues en tubes effilés et scellés à une température inférieure à 0°, ou mieux à 7°, et continue, obtenue par exemple au moyen de la machine *Audiffren-Singrün*, très commode pour les laboratoires qui disposent de force électrique. D'autres s'accommodent mieux de repiquages plus ou moins fréquents par simple piqûre dans des tubes droits de gélose peptone ou de gélose glucosée ; d'autres encore ne se conservent bien que dans le sang ou dans les liquides albumineux additionnés ou non de carbonate de chaux stérile.

La formule suivante a été recommandée :

Sérum formolé.

Ajouter à 500 centimètres cubes de sérum de cheval un centimètre cube de formol du commerce, mélanger. Après quelques instants de contact, ajouter un centimètre cube

d'ammoniaque (à 22° Baumé) pour neutraliser la formaldéhyde. Etendre de deux parties d'eau distillée et stériliser quinze minutes à 110° (Legroux).

Conservation des champignons.

Pour les moisissures du groupe des *Ascomycètes* (*Penicillium*, *Aspergillus*) il faut prendre soin de dessécher le milieu de culture, après la sporulation, sous une cloche à acide sulfurique et de conserver les spores dans des tubes bien secs, simplement bouchés à l'ouate et non scellés, pour que l'air y pénètre librement. Les spores restent ainsi vivantes et peuvent germer après plus d'un an.

Les *Mucorinées* se conservent mieux, au contraire, dans des tubes de bouillon sucré à 1 p. 100, sous une couche d'huile de vaseline stérile. L'anaérobiose favorise, pour elles, la formation de chlamydospores qui sont très résistantes et qui, réensemencées après plusieurs années, sont capables de développement (Pinoy).

Milieu de culture pour conserver les semences de levures.

Maltopeptone du commerce.	10 gr.
Saccharose.	20 gr
Eau.	1.000 cc.

A défaut de maltopeptone, on peut employer une décoction de touraillons (radicelles d'orge germée, résidu des malteries).

On fait bouillir pendant 15 minutes, 50 grammes de touraillons dans un litre d'eau, on ajoute saccharose (ou glucose) et on filtre.

Conservation et fixation des cultures mortes.

Pour fixer et conserver les cultures de démonstration, il est recommandable de se servir de tubes larges, de 16 millimètres par exemple, et de milieux aussi secs et transparents que possible. On introduit, entre le bouchon d'ouate et le verre, une languette de papier buvard imprégnée de formol commercial pur et on coule de la paraffine fondue sur le bouchon d'ouate, puis on obture le tube avec un capuchon de caoutchouc paraffiné ou avec un capuchon de cellulose. On peut encore, entre deux bouchons d'ouate, placer quelques fragments de trioxyméthylène et couler de la paraffine sur le bouchon extérieur.

Les cultures doivent être gardées dans une armoire à l'abri de la lumière.

Pour fixer les cultures de moisissures à leurs divers stades de développement on peut commodément employer le *liquide conservateur de Pinoy* :

Alcool à 80°.	300 cc.
Acide acétique.	20 gr.
Sublimé	10 gr.

et monter des préparations (qu'on bordera à la paraffine) dans le liquide suivant (Pinoy) :

Hydrate de chloral.	40 gr.
Glycérine.	20 gr.
Eau.	20 gr.

Sol. alcoolique d'acétate de plomb à 2 p. 100 : 10 cc. (filtrer).

Cette solution rend de grands services, surtout dans les pays chauds, parce qu'elle ne s'évapore pas. L'acétate de plomb diminue la trop grande transparence de l'hydrate de chloral et a la propriété de conserver beaucoup de pigments.

G. ***Expédition postale des cultures et matières virulentes.*** — Les dispositions à prendre pour ces envois ont été fixées en France par une instruction du Ministère de l'Intérieur du 2 février 1912. En voici les prescriptions essentielles :

1° Les cultures, matières ou liquides virulents doivent être enfermés dans des tubes ou flacons de verre épais. fortement bouchés et cachetés à la cire.

2° Ces tubes ou flacons seront introduits dans une boîte en métal solide, après avoir été entourés d'une couche d'ouate suffisamment épaisse.

3° La boîte métallique sera elle-même placée dans une seconde boîte en bois parfaitement close.

4° Chaque envoi devra porter d'une manière très apparente, du côté de l'adresse, la mention : *Matières destinées à un examen bactériologique.*

CHAPITRE IV

ALCALINISATION ET MESURE DE LA RÉACTION DES MILIEUX DE CULTURE

A. — PROCÉDÉ AU PAPIER DE TOURNESOL

Les bouillons préparés avec des peptones commerciales, et surtout avec la peptone Martin, ont généralement une réaction acide qui convient mal à la culture des bactéries. Pour les amener à la neutralité au tournesol, on ajoute peu à peu de petites quantités de solution normale de soude (à 40 pour 1.000) en mélangeant intimement, par agitation de la masse, avec une baguette de verre. Après chaque addition de soude on prélève une goutte de bouillon qu'on porte sur du papier de tournesol bleu et sur du papier de tournesol rouge. La teinte lilas correspond à la neutralité. Comme un grand nombre de bactéries se multiplient plus activement en milieu alcalin qu'en milieu acide, on ajoute, à partir du point neutre, 5 centimètres cubes de solution normale de soude par litre de bouillon.

B. — PROCÉDÉ A LA PHÉNOLPHTALÉINE

Ce procédé n'est applicable qu'à des liquides froids. Verser 10 centimètres cubes de bouillon à alcaliniser dans une fiole de Fourneau. Ajouter un volume suffisant d'eau distillée pour que le liquide apparaisse faiblement coloré en jaune, puis quelques gouttes de solution à 2 pour 100 de phtaléine du phénol dans l'alcool et agiter. Neutraliser en laissant tomber goutte à goutte de la solution décinormale de soude contenue dans une burette graduée, en mélangeant très intimement jusqu'à ce qu'une faible teinte rouge orangé apparaisse. A ce moment, on note le volume de solution sodique employé et on en ajoute deux nouvelles gouttes qui accentuent le virage. Pour neutraliser un litre de bouillon, il suffira d'y ajouter une quantité de soude cent fois plus grande que la quantité employée dans le précédent titrage.

C. — MÉTHODES ÉLECTROMÉTRIQUE ET COLORIMÉTRIQUE POUR LA DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS IONIQUES DES MILIEUX

Les méthodes au tournesol et à la phénolphtaléine ont l'inconvénient de ne pas indiquer l'acidité ou l'alcalinité vraie. Elles sont actuellement remplacées, dans les laboratoires, par les méthodes électrométrique et colorimétrique qui permettent de mesurer exactement la concentration en ions H^+ et OH^- libres des solutions.

Dans une solution aqueuse d'acide (chlorhydrique par exemple), il existe à la fois des ions H^+ et Cl^- libres, et une fraction non dissociée de la molécule HCl d'acide. Le rapport entre le produit des ions libres et la fraction non dissociée exprimé en molécules-grammes, est constant pour une température donnée $\frac{H^+ \times Cl^-}{HCl} = K$. Cette *constante de dissociation* est caractéristique de chaque acide. De même pour les ions OH^- des bases.

On choisit comme unité de concentration en ions H, la solution normale d'un acide qui renferme, par litre, 1 gramme d'hydrogène susceptible de se combiner avec une quantité équivalente d'ions OH^-.

L'eau pure est neutre et renferme, à la température ordinaire, environ 1×10^{-7} atomes grammes d'ions H^+ et 1×10^{-7} molécules grammes d'ions OH^-. Le nombre de molécules d'eau non dissociées étant constant, le produit ionique devient $K_o = H^+ \times OH^-$, soit 1×10^{-14}. Pour éviter l'emploi de nombres si infimes, *Sörensen* les a remplacés par le logarithme du nombre inverse désigné par le symbole *p*H. La concentration des ions H^+ par litre dans l'eau pure étant de 1×10^{-7} ou $\frac{1}{10.000.000}$, l'inverse de 10.000.000 a pour logarithme 7, *p*H = 7.

Toute solution, quelle que soit son acidité ou son alcalinité, renferme une certaine teneur en ions H^+ dont la concentration sert de mesure dans les deux cas.

Une solution N d'acide complètement ionisée a une concentration en ions H^+ de 1×1, *p*H = O.

Une solution $\frac{N}{10}$ d'acide a une concentration en ions H de 1×10^{-1} *p*H = 1.

Une solution $\frac{N}{100}$ d'acide a une concentration en ions H de 1×10^{-2} pH = 2.

Une solution $\frac{N}{1.000}$ d'acide a une concentration en ions H de 1×10^{-3} pH = 3.

Une solution N d'alcali complètement ionisée aurait une concentration en ions H+ de 1×10^{-14} pH = 14.

Une solution $\frac{N}{10}$ d'alcali aura une concentration en ions H+ de 1×10^{-13} pH = 13.

Pour transformer en pH une concentration H+ de $n \times 10^{-p}$, on additionnera le logarithme n à $n - p$. Ex. 2×10^{-7} log. 2 = 0,3, on aura 0,3 + (— 7) = — 6,7 pH = 6,7.

DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION EN IONS H+

Deux méthodes peuvent être utilisées pour déterminer cette concentration : la méthode électrométrique et la méthode colorimétrique imaginée par *Sörensen.*

Méthode électrométrique. — C'est la plus exacte, mais son application est assez délicate et nécessite un appareillage coûteux. Elle repose sur le principe suivant : lorsqu'on plonge dans une solution contenant des ions H+ une électrode de platine recouverte de noir de platine saturé d'hydrogène, il se produit, comme dans une pile, une force électromotrice par suite de la différence de potentiel entre l'électrode et le liquide ionisé. Cette différence de potentiel est égale à la différence des concentrations en ions H+ au niveau de l'électrode et de la solution. Connaissant la concentration en ions H+ de l'électrode, il est alors facile de déterminer celle de la solution.

Méthode colorimétrique. — Elle est basée sur les teintes différentes que présentent les solutions d'indicateurs colorés suivant la teneur en ions H+ des milieux. Avec une gamme suffisante de ces indicateurs, virant à des concentrations différentes en ions H+, on peut déterminer l'acidité vraie d'un liquide quelconque en le comparant à une concentration égale avec des tubes étalons de pH connu.

TABLEAU I

	Solution H^+ 10 N	Solution NH^+ pH 0	pH = 1	pH = 2	pH = 3	pH = 4	pH = 5	pH = 6	pH = 7	pH = 8	pH = 9	pH = 10	pH = 11	pH = 12	Concentration % de la sol. d'indicateur	Gouttes de sol. d'indicateur p. 10 cc. de milieu
Violet cristallisé (1) . . .	Jaune d'or	Vert	Bleu vert	Bleu	Violet										0,05	3 à 5
Orangé IV . .			Rouge	Chair	Jaune										0,01	3 à 5
Diméthylamino-azobenzène				Rouge	Chair	Jaune d'or									0,01 dans alcool 80°	5 à 10
Orangé III . .				Rouge	Rouge orangé	Orangé	Jaune								0,01	3 à 5
Rouge Congo.					Bleu	Violet	Ecarlate								0,01	3 à 5
Rouge de Méthyle. . . .					Rouge violet	Rouge	Orangé	Jaune							0,02 dans alcool 60°	4
Paranitrophénol. . . .							Inc.	Vert léger	Jaune vert						0,04 dans alcool 60°	3 à 20
Rouge neutre.	Bleu	Violet	Rouge						Rose	Orangé	Jaune				0,01 dans alcool 50°	10 à 20
α Naphtolphtaléine. . .									Inc.	Verdâtre	Bleu				0,04 dans alcool 60°	4 à 12
Orangé I. . .									Jaune	Rouge orangé	Rouge				0,01	4 à 10
Phénolphtaléine. . . .										Inc.	Rose	Rouge			0,05 dans alcool 50°	3 à 20
Thymolphtaléine . . .												Inc.	Bleu		0,04 dans alcool 50°	3 à 20
Jaune de Résorcine . .													Jaune vert	Orangé	0,01	5 à 10

(1) Ces indicateurs sont préparés par les établissements Kuhlmann qui peuvent les livrer en solutions toutes prêtes pour l'emploi.

Ces dernières années, l'École américaine a repris la question avec une grande précision. Elle propose l'emploi d'une échelle d'indicateurs très sensibles dont la plupart appartiennent à la série des sulfones phtaléines.

Ces indicateurs sont en pratique bicolores, jaunes en solution acide, rouges ou bleus en solution alcaline. L'un d'eux, la thymolsulfonephtaléine, peut être employé comme indicateur tricolore : outre le virage bleu vers pH 9, elle offre un virage rouge vers pH+ 2.

TABLEAU II

Indicateurs	Série de Clark virage	Limite de virage pH	Zone utile pH (utilisable avec les milieux colorés en jaune)
Tétrabromophénolphtaléine sulfonée (bleu de bromophénol)	jaune au bleu	3,0 — 4,6	4,0 à 4,6
Orthocarboxybenzène azodiméthylaniline	rouge au jaune	4,4 — 6	4,4 à 6
Dibromoorthocrésolphtaléine sulfonée (pourpre de bromocrésol)	jaune au violet	5,2 — 6,8	5,4 à 6 6
Dibromothymolphtaléine sulfonée (bleu de bromothymol)	jaune au bleu	6 — 7,6	6, à 7,6
Phénolphtaléine sulfonée (rouge de phénol)	jaune au rouge	6,8 — 8,0	6,8 à 8,0
Orthocrésolphtaléine sulfonée (rouge de crésol)	jaune au rouge	7,2 — 9	7,4 à 9
Thymolphtaléinesulfonée (bleu de thymol)	jaune au bleu	8 — 9,6	8,6 à 9,6
Orthocrésolphtaléine	incolore à rouge	8,2 — 9,8	9 à 9,6

Cette série de 8 indicateurs permet la détermination de pH 3,2 à pH 9,8 avec une grande approximation. On obtient, pour chaque indicateur, entre les deux points extrêmes du virage indiqués dans le tableau ci-dessus, une gamme de colorations assez différenciées ; de plus, les intervalles de virage pour les différents indicateurs chevauchent les uns sur les autres, ce qui permet de ne laisser aucun point douteux sans contrôle.

La méthode la plus simple de détermination de pH dans une solution consistera à comparer la couleur obtenue avec une même concentration d'indicateur sur le liquide à examiner et sur des tubes témoins de concentration pH connue.

Préparation des solutions mères d'indicateurs.

a) ***Sulfones phtaléines.*** — 0 gr. 1 de matière colorante en poudre est mis en solution dans un peu d'eau (15 cc. environ) additionnée de *n* cc. (variable suivant l'indicateur) de solution de soude N/20 ; on opère dans un petit vase d'Erlenmeyer et on chauffe. Après dissolution, on étend d'eau à 500 cc. dans une fiole jaugée [1]. On a, de la sorte, des solutions d'indicateur à 0,02 %.

n	= 5 cc. 7	pour	le rouge de phénol ;
	= 5,3	—	rouge de crésol ;
	= 4,3	—	bleu de thymol ;
	= 3	—	bleu de bromocrésol ;
	= 3,2	—	violet de bromocrésol ;
	= 3,7	—	pourpre de bromocrésol.

b) ***Rouge de Méthyle.*** — On le dissout à raison de 0 gr. 1 dans 300 cc. d'alcool et on amène à 500 cc. avec de l'eau = 0, 02 %.

c) ***Orthocrésolphtaléine.*** — Solution à 2 % dans l'alcool.

Préparation des étalons de concentration ionique.

1°. ***Échelle de pH 1 à pH 10 de 0,2 en 0,2.*** — Pour établir cette échelle, il faut tout d'abord préparer les solutions suivantes ;

a. Une solution de NaOH N/5. Le mieux est de l'étalonner sur une solution d'acide sulfurique N/5 préparée par la méthode décrite dans tous les ouvrages de chimie analytique, ou sur une solution de phtalate acide de potasse préparée comme ci-dessous.

La solution de soude devra être garantie contre l'action de CO^2.

b. La solution N/5 de phtalate acide de potassium Dis-

1. Nous dirons une fois pour toutes que l'eau à employer dans toutes ces opérations doit être de l'eau distillée aussi pure que possible et bouillie avant l'emploi pour chasser CO^2. La verrerie à utiliser doit être en verre neutre, c'est-à-dire ne cédant pas d'alcali à l'eau.

soudre 40 gr. 828 de phtalate acide pur et amener à 1 litre avec de l'eau distillée dans une fiole jaugée.

c. Solution N/5 de phosphate acide de potassium PO^4H^2K. Dissoudre 27 gr. 231 de PO^4H^2K pur, recristallisé, séché à 100°, et amener à un litre.

d. Solution double d'acide borique N/5 et de chlorure de potassium N/5. Dissoudre 12 gr. 405 d'acide borique séché à l'air, à poids constant, et 14 gr. 912 KCl pur ; amener à un litre.

e. Solution de chlorure de potassium N/5 14 gr. 912 KCl pur par litre.

f. Solution d'acide chlorhydrique N/5 préparée avec HCl pur et titrée sur la solution de soude *a*.

A l'aide de ces solutions, on pourra préparer l'échelle de solutions suivante de pH déterminé :

Table donnant la composition de mélanges de pH connu à des intervalles de 0,2 à température = 20° (Clark et Lubs).

TABLEAU III

pH :				
1,0	50 cc. KCl N/5	+ 97,0 cc.	HCl N/5	compl. 200 cc. av. H^2O :
1,2	»	+ 64,5	»	»
1,4	»	+ 41,5	»	»
1,6	»	+ 26,3	»	»
1,8	»	+ 16,6	»	»
2,0	»	+ 10,6	»	»
2,2	»	+ 6,7	»	»
2,2	50 cc. Phtalate acide de K N/5	+ 46cc7	HCl N/5	compléter à 200 cc. ;
2,4	» »	+ 39,6	»	»
2,6	» »	+ 32,95	»	»
2 8	» »	+ 26,42	»	»
3,0	» »	+ 20,32	»	»
3,2	» »	+ 14,7	»	»
3 4	» »	+ 9,9	»	»
3,6	» »	+ 5,97	»	»
3,8	» »	+ 2,63	»	»
4,0	50 cc. Phtalate acide de K N/5	+ 0cc4	Soude N/5	compléter à 200 cc. ;
4,2	» »	+ 3,7	»	»
4,4	» »	+ 7,5	»	»
4,6	» »	+ 12,15	»	»
4,8	» »	+ 17,7	»	»
5,0	» »	+ 23,85	»	»

5,2	»	»	+ 29,95	»	»
5,4	»	»	+ 35,45	»	»
5.6	»	»	+ 39,85	»	»
5,8	»	»	+ 43 0	»	»
6,0	»	»	+ 45,45	»	»
6,2	»	»	+ 47,0	»	»
5,8	50 cc. Phosphate ac. de K N/5		+ 3cc72	Soude N/5	compléter à 200 cc. ;
6,0	»	»	+ 5,70	»	»
6,2	»	»	+ 8,6	»	»
6,4	»	»	+ 12 6	»	»
6,6	»	»	+ 17,8	»	»
6 8	»	»	+ 23,65	»	»
7.0	»	»	+ 29,63	»	»
7.2	»	»	+ 35,0	»	»
7.4	»	»	+ 39,5	»	»
7,6	»	»	+ 42,8	»	»
7,8	»	»	+ 45,2	»	»
8,0	»	»	+ 46,8	»	»
7,8	50 cc. Ac. Borique N/5	KCl N/5	+ 2cc61	Soude N/5	compléter à 200 cc. ;
8,0	»	»	+ 3,97	»	»
8,2	»	»	+ 5,9	»	»
8,4	»	»	+ 8,5	»	»
8,6	»	»	+ 12,0	»	»
8,8	»	»	+ 16,3	»	»
9,0	»	»	+ 21,3	»	»
9,2	»	»	+ 26,7	»	»
9,4	»	»	+ 32,0	»	»
9.6	»	»	+ 36,85	»	»
9 8	»	»	+ 40 8	»	»
10,0	»	»	+ 43,90	»	»

Pour établir l'échelle colorimétrique, mesurer exactement, dans des tubes en verre neutre bien calibrés, 10 cc. de chaque solution et ajouter 1 cc. de solution d'indicateur à 0,01 % (solutions mères diluées une fois). Faire une série pour chaque indicateur dans les limites de son virage indiquées au *tableau 2*. On opère en tubes préalablement étirés et on scelle à la lampe après remplissage.

Pour déterminer le pH d'une solution quelconque, on essayera la réaction de cette solution sur les huit indicateurs. On mesure exactement 10 cc. de la solution dans 8 tubes différents ; à chaque tube on ajoute 1 cc. de solution à 0,01 % d'un des indicateurs.

Pour des pH 1,2 à 9,8, les tubes seront hors série avec certains indicateurs, mais il en restera au moins un qui présentera une teinte pouvant se classer dans une des séries de tubes étalons. On peut utiliser, pour finir la détermination, le petit comparateur dont il sera question à propos de l'ajustement des milieux à un pH donné. L'emploi

de cet appareil est indispensable dans le cas d'une solution colorée par elle-même.

2° ***Echelles pH 6,6 à pH 8.*** — En général, en biologie (détermination de la concentration en ions H+ de liquides organiques, ajustement d'un milieu de culture à pH déterminé, etc.), on pourra opérer avec une échelle d'étalons bien moins étendue. La phénolsulfonephtaléine sera le seul indicateur employé.

1re Formule. — Un mélange simple de phosphates sert à préparer les étalons.

On préparera :

a. Solution N/5 phosphate monopotassique :

9 gr. 078 de sel recristallisé, séché à 100° à poids constant, sont dissous dans 500 cc d'eau ; on ajoute 45 cc. 5 de solution d'indicateur (phénolsulfonephtaléine) à 0,02 % et on complète à 1 000 dans une fiole jaugée, avec de l'eau distillée.

b. Solution N/5 phosphate disodique :

Le sel commercial pur est à 12 H^2O ; on l'effleurit en couche mince à température ordinaire (18-20°) à poids constant ; l'opération demande 8 à 15 jours. On obtient le sel $PO^4Na^2H + 2H^2O$.

11 gr. 876 de ce sel sont dissous dans 500 cc. d'eau ; on ajoute 45 cc. 5 de solution de phénolsulfonephtaléine à 0,02 % et on complète à 1.000 cc. avec de l'eau.

A l'aide des deux solutions précédentes, on prépare, dans une fiole jaugée de 100 cc., la série suivante d'étalons (Sörensen) :

Composition des mélanges de phosphates donnant des solutions de pH 6,6 à pH 8 de 0,1 en 0,1.

TABLEAU IV

38 cc.	PO^4HNa^2 N/15	amenés à 100 cc.	avec la solution	N/15 de PO^4HK^2	= *p*H 6,6
43,5	»	»	»	»	= *p*H 6,7
49,5	»	»	»	»	= *p*H 6,8
55,5	»	»	»	»	= *p*H 6,9
61,0	»	»	»	»	= *p*H 7,0
66,5	»	»	»	»	= *p*H 7,1
72,0	»	»	»	»	= *p*H 7,2

76,5	»	»	»	»	= pH 7,3
80,5	»	»	»	»	= pH 7,4
84,0	»	»	»	»	= pH 7,5
86,5	»	»	»	»	= pH 7,6
89,0	»	»	»	»	= pH 7,7
91,3	»	»	»	»	= pH 7,8
93,0	»	»	»	»	= pH 7,9
94,5	»	»	»	»	= pH 8,0

2e ***Formule***. — Une autre formule permet d'obtenir des solutions étalons de même ordre ; on emploie alors seulement le phosphate mono-potassique et la soude titrée.

A. Solution de PO^4H^2K N/5 : peser 13 gr. 613 de sel recristallisé, séché à 100° à poids constant, les dissoudre dans 300 cc. d'eau chaude. Refroidir, ajouter 91 cc. de solution de phénolsulfonephtaléine à 0,02 %. Amener à 500 cc. dans une fiole jaugée avec de l'eau.

B. Solution de soude N/10 exactement titrée sur un acide de titre connu (conserver à l'abri de CO^2). On n'ajoute pas d'indicateur à la solution B.

Avec ces deux solutions on fait les mélanges suivants dans une fiole jaugée de 100 cc. :

Mélanges de PO^4H^2K et de soude donnant des solutions pH 6,6 à pH 8 de 0,2 en 0,2.

TABLEAU V

Solution N/5 PO^4H^2K	Soude N/10	Amener avec de l'eau à	pH
25 cc.	17 cc. 80	100 cc.	6,6
25 cc.	23,65	100 cc.	6,8
25 cc.	29,63	100 cc.	7,0
25 cc.	35,00	100 cc.	7,2
25 cc.	39,50	100 cc.	7,4
25 cc.	42,80	100 cc.	7,6
25 cc	45,20	100 cc.	7,8
25 cc.	46,80	100 cc.	8,0

Que l'on emploie l'une ou l'autre formule de phosphates, les solutions étant faites, on remplit des divers mélanges une série de tubes étirés, en verre neutre ; on les scelle à la lampe et on indique sur chaque tube le pH correspondant.

Les gammes d'étalons se conservent longtemps si on les garde à l'abri de la lumière.

Pour la détermination du pH dans une solution

quelconque dans les limites de 6,6 à 8, mesurer exactement 10 cc. de la solution et ajouter 1 cc. de solution à 0,01 % de phénolsulfonephtaléine. Chercher sa place dans l'échelle étalon. Opérer avec le comparateur décrit ci-dessous dans le cas d'un liquide dont la coloration propre peut masquer ou modifier la teinte de l'indicateur.

Ajustement de la réaction d'un milieu de culture. — Pour l'ajustement de la réaction d'un milieu de culture à un pH donné, on se trouve dans le cas d'un liquide dont la teinte plus ou moins jaune brun (bouillons, infusions, etc.) peut modifier la teinte de l'indicateur.

On opérera sur les milieux froids et on utilisera le comparateur. Ce petit appareil est un simple bloc de bois percé, à la face supérieure, de six trous en 3 rangs de deux, au calibre des tubes à essai employés ; les tubes à essai entrent de la moitié de leur longueur dans le bloc de bois, comme dans un porte-tube ordinaire. Deux des faces latérales sont pleines, les deux autres sont percées de trois fenêtres qui donnent la lumière au travers des trois rangs de deux tubes. On dispose pour chaque essai les tubes dans l'ordre suivant :

Fenêtre

Direction des Rayons lumineux ↓			
	I Etalon	II Eau pure	III Etalon
	pH < pH à obtenir		pH > pH à obtenir
	IV Milieu sans indicateur	V Milieu à ajuster + indicateur	VI Milieu sans indicateur

Observateur

Dans ces conditions, le changement de teinte propre à la coloration du milieu se trouve compensé du fait de la présence du milieu dans les trois champs de vision.

On ajoute au tube V, qui renferme 5 cc. de milieu exactement mesuré, 0 cc. 5 d indicateur (phénolsulfonephtaléine) à 0,01 %. Avec une microburette (pipette de 1 à 2 cc. divisée en dixièmes et munie d'un petit tube de caoutchouc avec une pince à pression), on laisse tomber, dans ce tube,

une solution de soude N/20 jusqu'à ce qu'on obtienne une teinte intermédiaire entre celles des deux étalons I et II vus au travers des tubes de milieu IV et VI.

La solution de soude N/20 à employer s'obtient en mélangeant 500 cc. de soude N/10 avec 91 cc. de phénolsulfonephtaléine à 0,01 % et complétant à 1.000 avec de l'eau.

Connaissant le volume *n* de la solution de soude N/20 nécessaire pour amener 5 cc. du milieu à la réaction voulue, le nombre de centimètres cubes *x* de solution N de soude à ajouter à 1 litre de milieu pour l'amener au pH cherché sera

$$x = 10n$$

Par un petit dosage analogue, on pourra déterminer la quantité d'acide produite par fermentation sur un milieu de pH connu au départ de la culture. Il sera bon de centrifuger dans ce cas pour avoir un liquide clair.

Les sucres s'altèrent au cours de la stérilisation des milieux par chauffage, surtout lorsque leur réaction est alcaline, et ils modifient le pH. Il convient de les stériliser à part, en solution aqueuse, et de ne les ajouter aux milieux qu'après le chauffage définitif à l'autoclave.

D. — MÉTHODES COLORIMÉTRIQUES SANS SOLUTIONS SPÉCIALES

Ces méthodes permettent de déterminer le pH sans employer de solutions étalons.

Méthode de Michaelis. — Un indicateur monocoloré comme le nitrophénol développe sa couleur avec le maximum d'intensité au terme du virage du côté alcalin ; à égale distance entre ce point et le terme du virage du côté acide, l'intensité totale est moitié moindre et, par suite, on obtient la même teinte que si on employait moitié moins d'indicateur à la limite alcaline de virage. On construit une échelle en ajoutant à une même solution alcaline des quantités croissantes d'indicateur.

Méthode de Barnett et Chapman. — A égale distance des limites acide et alcaline de virage, la teinte obtenue avec les indicateurs bicolores de Clark et Lubs est un mélange à parties égales de la couleur acide et de la couleur alcaline. De même, lorsqu'on met la moitié de l'indicateur dans une

solution acide et l'autre moitié dans une solution alcaline, la nuance observée est mixte.

Technique d'après Médalia. — On met dans sept tubes 10 cc. de soude N/20 et dans sept autres 10 cc. d'acide chlorhydrique à 0,1 %. Puis on ajoute à la première série 0,1, 0.2... 0,7 de solution d'indicateur, et dans la seconde 0,7, 0,6 .., 0,1 de la même solution. On forme ainsi sept paires de tubes dont chacune contient 0,8 d'indicateur. A 10 cc. du liquide à examiner on ajoute également 0 cc. 8 d'indicateur. On compense la couleur propre du milieu à l'aide du comparateur à 2 rangées de 3 trous. *Dans la première rangée* on dispose les tubes dans l'ordre suivant : tube contenant le milieu sans indicateur ; tube acide et tube alcalin ; *dans la seconde,* tube contenant le milieu additionné d'indicateur et deux tubes d'eau distillée.

On emploie les indicateurs de Clarck et Lubs en solution à 0,2 p. 100, sauf le rouge de phénol qui doit être à 0,04 %. Pour le bleu de thymol, 1° zone acide : on ajoute 0,5 p. 100 d'HCl dans les tubes les plus acides et 0,001 p. 100 dans les moins acides, qui représentent la série alcaline ; 2° zone alcaline : HCl à 0,001 p. 100 dans les tubes acides. Pour le bleu de bromophénol, NaOH N/200 dans les tubes alcalins.

Le pH des couples s'établit par comparaison de la teinte obtenue avec celle des solutions étalons. Le point de demi-virage, c'est-à-dire le couple qui a la même quantité d'indicateur dans les deux séries, a les pH suivants :

Bleu de thymol.	2,0
Bleu de bromophénol.	3,87
Rouge de méthyle.	5,01
Violet de bromocrésol.	6,28
Bleu de bromothymol.	7,08
Rouge de phénol.	7,77
Rouge de crésol.	8,13
Bleu de thymol.	8,86

Ces chiffres donnent le pH de la 4e paire ; pour la 3e et la 5e on retranche ou ajoute 0,2 ; pour la 2e et la 6e, 0,45 ; pour la 1re et la 7e, 0,80. Les résultats sont exacts à 0,05 ou 0,1 près.

CHAPITRE V

MÉTHODES DE PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE USUELS

NOTA. — Les milieux de culture destinés aux inoculations doivent, en général, être préparés sans peptone.

A. — Préparation du bouillon de viande.
(*Bouillon simple, non peptoné*) [1].

500 grammes de viande de bœuf ou de veau, débarrassée de graisse et de tendons, sont hachés finement au hache-viande.

On met ce hachis dans un bocal dans lequel on verse 1 litre d'eau du robinet, froide. On remue un instant avec une cuiller de bois. On laisse en repos le bocal couvert d'un linge pendant quatre heures, temps suffisant pour la dissolution de toutes les substances nutritives. On remue encore à la cuiller et on verse le contenu du bocal dans une marmite émaillée qu'on porte sur le feu. On chauffe doucement et on laisse bouillir 10 minutes en remuant constamment avec la cuiller de bois. Les matières albuminoïdes sont ainsi coagulées.

On filtre ensuite le mélange sur un linge de toile et on verse le liquide dans une autre marmite. On exprime la viande cuite restée sur le linge, en tordant fortement celui-ci, pour en faire sortir tout le jus. On laisse refroidir et on filtre sur papier mouillé pour retenir les particules de graisse entraînées mécaniquement.

On alcalinise ensuite avec une solution de soude pure à

1. Pour la préparation des bouillons destinés à l'obtention des *toxines diphtérique* ou *tétanique*, voir respectivement les chapitres XXVII et XL. La viande de cheval ne doit pas être employée pour la préparation des milieux de culture en général. Beaucoup de microbes poussent très bien dans le bouillon de cheval, mais certains de leurs caractères (chromogénie surtout) s'y trouvent modifiés.

1 p. 10 qu'on ajoute goutte à goutte, *en agitant fortement* le liquide dans lequel on a plongé un gros fragment de papier de tournesol bleu qui rougit aussitôt et un autre fragment de papier de tournesol rouge. Quand les deux papiers prennent une teinte légèrement violacée, la neutralité est obtenue. (Pour la culture de la plupart des microbes pathogènes, il convient de pousser l'alcalinisation un peu plus loin : on ajoute alors, par litre, 5 à 7 cc. 5 de lessive normale de soude.) Il se produit un trouble dû à la précipitation des phosphates alcalino-terreux.

On porte alors la marmite à l'autoclave, on chauffe sous pression à 120° pendant 20 minutes, puis on filtre sur papier Chardin. Le bouillon filtré est recueilli dans des ballons, ou réparti en tubes qu'on bouche à l'ouate (non hydrophile) et qu'on stérilise de nouveau à 115° seulement, pendant 20 minutes.

Le même bouillon *peptoné* et *salé* se prépare en ajoutant au liquide, avant l'alcalinisation par la soude, 20 grammes de peptone et 5 grammes de sel de cuisine par litre.

Dans les laboratoires de sérothérapie, où l'on peut disposer des caillots de sang provenant de la saignée des animaux producteurs des sérums thérapeutiques, il est très recommandable et économique d'employer ces caillots, au lieu de viande, à la préparation des bouillons de culture destinés aux analyses d'eaux d'alimentation par exemple.

Voici comment il convient de les utiliser :

On pèse 1 kilogramme de caillots (fragmentés grossièrement avec la main ou avec une cuiller de bois) et on y ajoute 1 litre et demi d'eau. On laisse en contact pendant 24 heures à la température du laboratoire en remuant de temps en temps la masse. On filtre celle-ci sur un linge de toile et on porte le filtrat à l'autoclave à 115° pendant une demi-heure. On filtre ensuite de nouveau sur un linge d'abord, puis sur un entonnoir garni d'ouate hydrophile. Ce liquide remplace la macération de viande.

On peut, à la rigueur, remplacer la macération de viande, lorsque celle-ci fait défaut, par une macération de levure de brasserie ou de distillerie préparée de la façon suivante :

On purifie d'abord la levure en la mettant en suspension dans une grande quantité d'eau (20 litres par exemple pour 2 kg. 500 de levure pressée) dans laquelle on verse, par

petites portions, 150 à 200 grammes d'acide chlorhydrique. La levure se dépose en flocons. On décante et rejette le liquide surnageant ; on recueille la levure sur un linge, on l'essore et on en fait macérer 2 kg. 500 dans 4 litres d'eau de conduite. On porte sur le feu et on fait bouillir pendant quelques instants en agitant constamment avec une cuiller de bois. On ajoute encore 5 litres d'eau de conduite. On laisse la levure se déposer pendant 3 heures et on filtre. Au liquide clair recueilli on ajoute 10 grammes de peptone et 5 grammes de chlorure de sodium par litre. On neutralise, on stérilise à 115° et on filtre.

Ce milieu peut servir à cultiver la plupart des microbes de l'eau ou de l'air et beaucoup de microbes pathogènes.

On peut aussi employer, pour cultiver la plupart des microbes, le *Bouillon de légumes d'Albert Berthelot :*

Dans 4 litres d'eau on met 300 grammes de pommes de terre pelées et coupées en morceaux menus, 150 grammes de carottes et 150 grammes de navets. On fait bouillir 4 heures jusqu'à réduction à 3 litres. On passe sur toile fine et on ramène à 3 litres par addition d'eau distillée. On alcalinise faiblement (au tournesol) avec de la soude. On stérilise à l'autoclave, on laisse reposer 24 heures en glacière et on filtre sur papier. On répartit et on stérilise 20 minutes à 115°.

Ce bouillon sans peptone est recommandable pour la culture des microbes-vaccins. On peut le gélatiniser ou le géloser ;

Les champignons y poussent bien, à la condition de ne pas l'alcaliniser à la soude, d'y ajouter 2 à 5 p. 100 de malto-peptone et, s'il y a lieu, 2 à 10 p. 100 d'un hydrate de carbone.

On peut le peptoner en l'additionnant de son volume de peptone de Martin.

B. — Préparation du bouillon à l'extrait de viande Liebig.

Peser 5 grammes d'extrait de viande Liebig qu'on fait dissoudre dans un litre d'eau tiède à 50 ou 55°. Ajouter : peptone 10 grammes et sel marin 5 grammes. Neutraliser ensuite, comme pour le bouillon ordinaire, jusqu'à ce que

le papier de tournesol rouge vire nettement au bleu. Porter à l'autoclave à 120°, 20 minutes. Filtrer sur papier Chardin. Répartir en ballons ou en tubes et stériliser à 115°, 20 minutes.

C. — Préparation de l'eau peptonée simple.

Solution de 30 grammes de peptone (de Chapoteau ou autre) dans l'eau distillée. On fait bouillir et on neutralise à la soude pendant l'ébullition. On filtre sur papier, on répartit en tubes à essai ou en matras et on stérilise à 115° pendant 20 minutes.

D. — Préparation du bouillon Martin (*procédé recommandé*).

1° *Solution de peptone.* — On prend cinq estomacs de porc qu'on lave à grande eau et qu'on passe au hachoir après avoir enlevé la graisse adhérente.

On fait une macération de ce produit haché dans les proportions suivantes :

Estomac de porc haché.	200 gr.
Acide chlorhydrique pur.	10 cc.
Eau tiède à 50°.	1 litre.

On laisse dans un bain-marie à 50° environ, pendant 24 heures [1]. Ensuite on porte à l'autoclave (non-boulonné) et on chauffe à 100° pendant une demi-heure. On verse sur un tamis recouvert de coton hydrophile.

On neutralise le liquide filtré et chaud en ajoutant de la soude à 1 p. 10 ou du carbonate de soude à 1 p. 10 jusqu'à ce que le papier rouge de tournesol bleuisse nettement.

On filtre sur papier et on répartit en ballons de 1 litre, par 500 grammes. On stérilise à 115° pendant une demi-heure pour conserver.

2° *Macération de viande.* — On fait macérer pendant 20 à 24 heures, à l'étuve à 37°, 500 grammes de viande hachée, dans 1 litre d'eau.

1. Ou un temps moins long si l'on désire obtenir une peptone plus riche en *albumoses*.

On passe à travers un linge, on exprime le jus et on ajoute 5 grammes de sel marin.

3° *Mélange final.* — On mélange 500 grammes de solution de peptone à 500 grammes de macération de viande. On chauffe à 70° et on alcalinise légèrement avec de la soude. Pour la culture du bacille de la diphtérie, on neutralise d'abord exactement à la soude et, lorsque le papier de tournesol rouge commence à bleuir, on ajoute au liquide, par litre, 7 centimètres cubes de lessive normale de soude (à 40 p. 1.000).

Porter à l'autoclave à 120° pendant 15 minutes. Filtrer sur papier Chardin, répartir en ballons ou en tubes et stériliser à 115°, pendant 20 minutes.

E. — **Préparation de la gélatine nutritive.**

On prépare du bouillon de viande ordinaire, ou du bouillon peptoné à l'extrait de viande Liebig et, en même temps qu'on additionne celui-ci de peptone et de sel marin, on ajoute, en plus, 150 grammes (par litre) de gélatine en feuilles [1] que l'on fait fondre dans le liquide chaud en agitant avec la cuiller, sans dépasser la température de 80°.

On neutralise ensuite (la gélatine est toujours très acide) et on alcalinise légèrement avec 5 centimètres cubes de lessive de soude normale, de telle sorte que le papier de tournesol rouge bleuisse un peu.

On porte à l'autoclave et on chauffe 10 minutes à 110° seulement, dans la marmite émaillée.

Au sortir de l'autoclave, on laisse refroidir jusque vers 60°, puis on colle la gélatine avec une solution de blanc d'œuf faite en battant un blanc d'œuf dans un verre conique avec 50 ou 100 centimètres cubes d'eau, qu'on verse par fractions, en agitant fortement, dans le bouillon gélatiné. On reporte de nouveau à l'autoclave. On chauffe 10 minutes à 115° et on filtre dans un entonnoir à chaud. Répartir en ballons ou en tubes qu'on stérilise de nouveau 10 minutes

1. On emploie le plus souvent, dans les laboratoires français, la gélatine marque Coignet (dorée) qui est excellente. C'est une gélatine d'os. Elle fond à 25°. Dans les pays chauds on peut avantageusement se servir de gélatine de poisson ou colle de poisson (préparée avec les vessies natatoires d'esturgeons) et qui n'est fusible qu'à 30°.

à 115° et qu'on solidifie suivant les besoins, inclinés ou droits.

Certaines gélatines ne se solidifient plus lorsqu'on les a chauffées sous pression à 115°. Mais cela est rare. Il faut alors stériliser seulement à 100° par chauffage discontinu, une heure chaque fois, trois jours de suite, dans l'autoclave non boulonné.

F. — **Préparation de la gélose nutritive.**

On prépare du bouillon de viande normal, ou du bouillon Martin, ou du bouillon à l'extrait Liebig et, après *neutralisation* et *alcalinisation légère* on ajoute, par litre, 15 grammes de gélose[1] qu'on a préalablement coupée en fragments, lavée et fait gonfler pendant quelques heures dans un peu d'eau. Cette gélose, exprimée, se dissout dans le bouillon chaud qu'on maintient aux environs de 100° en agitant avec la cuiller.

Lorsque la dissolution est achevée, on vérifie la réaction qui doit être toujours un peu alcaline. Sinon, on ajoute quelques gouttes de solution au 1/10 de carbonate de soude, jusqu'à ce que le papier de tournesol bleuisse, et on ajoute encore 5 cc. de lessive normale de soude. On laisse refroidir aux environs de 60° et on colle la gélose au blanc d'œuf en mélangeant à toute la masse de bouillon gélosé (par petites portions et en agitant fortement) un blanc d'œuf qu'on a battu à part dans un verre conique avec 50 ou 100 cc. d'eau.

On porte alors, dans la marmite, le bouillon gélosé à l'autoclave ; on chauffe à 120° pendant 15 minutes, puis, au sortir de l'autoclave, on verse sur un filtre en papier Chardin mouillé, dans un entonnoir à bain-marie. (A défaut d'entonnoir à bain-marie, on peut filtrer directement dans l'autoclave qu'on maintient à la température de 80° environ non boulonné.)

On reçoit la gélose filtrée, soit dans des ballons, soit dans

1. La gélose ou agar-agar est fournie par diverses algues particulièrement abondantes dans les mers de Chine. Ce sont : *Gelidium cartilagineum* ou *corneum*, *Gracilaria lichenoïdes*, *Euchema spinosum*, etc. Elle n'est fusible qu'au-dessus de 40°. C'est une *pararabine* (sorte de pectine) faiblement azotée. Sa formule chimique, d'après Greenish, est $C^{24}H^{38}O^{19}$, soit 4 $C^{6}H^{10}O^{5}$-$H^{2}O$). Elle a un pouvoir *fixateur* considérable, par exemple vis-à-vis de l'alexine des sérums frais.

des tubes qu'on stérilise de nouveau à 115° pendant 20 minutes et qu'on laisse solidifier droits ou inclinés, suivant les besoins.

Gélose glycérinée. — Préparée comme il vient d'être dit.

En même temps que le blanc d'œuf pour le collage, ou aussitôt après, on ajoute 40 à 60 grammes de glycérine pure par litre.

Gélose sucrée. — Préparée comme il vient d'être dit. On substitue à la glycérine 20 grammes par litre (2 p. 100) de sucre (glucose, ou saccharose, ou lactose, ou maltose).

Gélose au sérum (de *Joos*). On verse dans un ballon de 2 litres de capacité :

300 cc. de sérum de cheval.
150 cc. de bouillon ordinaire.
50 cc. de solution normale de soude à 40 p. 1.000.

Porter ce ballon pendant 2 à 3 heures dans un bain-marie entre 60 et 70°, puis 30 minutes à l'autoclave à 100° (autoclave non boulonné). Ajouter ensuite 500 cc. de bouillon chaud, stérile, dans lequel on a fait dissoudre 20 grammes de gélose.

Répartir et stériliser 15 minutes à 120°.

G. — Préparation du lait comme milieu de culture.

Le lait du commerce doit être d'abord légèrement alcalinisé par quelques gouttes de solution de carbonate de soude à 1 p. 10 jusqu'à ce qu'il bleuisse légèrement le papier de tournesol.

Répartir en tubes. Stériliser par 3 chauffages successifs à 100° à 24 heures d'intervalle et de 30 minutes chacun. La stérilisation à 115° altère le lait en peptonisant la caséine et caramélisant le lactose).

Lait tournesolé. — Même préparation. On ajoute au lait, légèrement alcalinisé, de la teinture de tournesol en quantité suffisante pour donner une teinte nettement violette. On peut, plus commodément, avoir de la teinture de tournesol toute stérilisée à part et l'ajouter, avec une pipette stérile, au fur et à mesure des besoins.

Petit lait. — On détermine, par une épreuve préalable,

pour le lait dont on dispose, la quantité de HCl (au dixième) en centimètres cubes qu'il faut pour provoquer la coagulation de 100 cc. de lait porté à 100°. Cette détermination faite, on porte à l'ébullition le lait total et on ajoute le volume d'HCl reconnu nécessaire, puis un léger supplément goutte à goutte, jusqu'à ce que la coagulation soit complète. On laisse refroidir pendant quelques heures ; on filtre sur un entonnoir garni d'ouate hydrophile, puis sur papier Chardin mouillé. Entre ces deux filtrations on alcalinise au carbonate de soude au dixième, jusqu'à bleuissement net du papier de tournesol rouge. On ajoute, s'il y a lieu, la quantité de teinture de tournesol nécessaire pour teinter le liquide en violet pâle ; on répartit en tubes et on stérilise, comme pour le lait, à 100° trois jours de suite, 30 minutes chaque fois.

H. — Préparation des pommes de terre pour cultures.

Les tranches de pommes de terre, enlevées et coupées à l'emporte-pièce, doivent être immédiatement immergées dans un cristallisoir contenant une solution de bicarbonate de soude à 10 p. 1.000 [1]. Après une ou deux heures, on les essuie dans un linge, puis on les répartit en *tubes étranglés* de *Roux* et on stérilise à l'autoclave maintenu pendant 20 minutes à 120°. Au sortir de l'autoclave, on étale les tubes à plat, de telle sorte que la face plane de chaque fragment de pomme de terre soit dirigée en bas. On évite ainsi l'incurvation des fragments et l'adhérence de la face convexe à la paroi du verre. Après quelques heures dans cette position, on relève les tubes et on les maintient droits.

Pommes de terre glycérinées. — Préparées comme ci-dessus, mais, au lieu de les tremper dans le bain de bicarbonate de soude, on les immerge pendant 48 heures dans de l'eau glycérinée à 5 à 6 p. 100. On remplit ensuite, avec la même eau glycérinée, ou du bouillon glycériné, les

1. Cette immersion dans la solution de bicarbonate de soude est surtout indispensable lorsqu'on emploie des pommes de terre un peu anciennes, qui sont généralement très acides. Les pommes de terre nouvelles le sont beaucoup moins. On peut les utiliser sans autre précaution.

tubes de Roux jusqu'à l'étranglement, et on les garnit de leur fragment de pomme de terre. Stériliser comme il est dit précédemment.

I. — Gélose au sang de lapin et plasma coagulé de Gessard.

a) Gélose sèche 7 grammes. Laver dans un courant d'eau pendant environ 12 heures. Egoutter.

Peser dans une capsule tarée. Ajouter :

NaCl.	3 gr.
Eau.	Q. S. pour 450 gr. de poids total, plus la tare de la capsule.

Verser le tout dans un ballon. Stériliser à l'autoclave et répartir par 3 cc. dans des tubes à essai (droits).

Dans chaque tube préalablement liquéfié à 45° au bain-marie, on répartit ensuite environ 1 cc. de sang prélevé dans le cœur d'un lapin avec une seringue stérile (voir pour cette technique, chap. xv, C). Avant la ponction, la peau du lapin doit être soigneusement aseptisée à l'iode. Après la ponction aspiratrice, changer l'aiguille et la remplacer, pour la répartition du sang, par une autre aiguille sortant de l'eau bouillante ; ou bien répartir directement avec le bec de la seringue débarrassée de son aiguille et qu'on a pris soin d'éviter de toucher avec les doigts.

b) Milieu solide préparé a froid, de Gessard. — On recueille aseptiquement, au sortir de la veine du cheval, du bœuf, du mouton ou du porc, 300 cc. de sang dans 100 cc. d'eau distillée stérile contenant 20 grammes de chlorure de sodium. Après dépôt des hématies. le liquide surnageant est apte à coaguler par son mélange à l'eau, dans la proportion d'un dixième en volume. Le coagulum ne se rétracte que faiblement et après un long temps, même à la température de l'étuve.

On peut réincorporer les hématies au taux originel et réaliser ainsi un équivalent du caillot sanguin, sous le degré de dilution susdit. Pour cela, les hématies sont

mises dans l'eau physiologique. La dose coagulante est ensuite mélangée.

On peut introduire dans ce milieu coagulable du glucose, de la glycérine, des sels, etc... en solution stérile. En cas de retard dans la coagulation, ajouter à la dose primitive quelques gouttes de solution au dixième de chlorure de sodium.

Ce milieu est utile pour les recherches qui réclament l'intégrité des principes animaux et des propriétés humorales.

J. — Bouillon-œuf de Besredka-Jupille.

Réunir les jaunes de vingt œufs (350 centimètres cubes) dans un grand verre à pied et ajouter un litre d'eau distillée. L'eau doit être pure et avoir une réaction neutre ; dans le cas où elle serait acide, on commence par la neutraliser.

Le temps le plus délicat de la préparation est la clarification de l'émulsion au moyen de la solution de soude à 1 p. 100 ; l'excès de soude rend le milieu impropre à la culture, le défaut de soude nuit à la transparence du milieu.

On évite ces écueils en versant d'abord une quantité de soude égale à la moitié de la quantité de jaunes réunis. Ainsi à 350 centimètres cubes de jaune on ajoute, par petites portions, 175 centimètres cubes de solution de soude à 1 p. 100.

On s'arrête un moment pour s'assurer du degré de la solubilisation en aspirant chaque fois le jaune dans une pipette. On suit de la sorte la clarification ; celle-ci est arrivée au point optimum lorsque le liquide apparaît transparent en couche mince. dans la pipette par exemple, et qu'il reste légèrement opaque en couche épaisse, ou à travers les parois du verre à pied. Une dizaine de centimètres cubes, ajoutés à 175 centimètres cubes précédemment versés, suffisent généralement.

Avec de l'eau distillée, on complète jusqu'à obtenir, dans le cas particulier, sept litres de liquide dans lequel le jaune est représenté par la proportion de 1 : 20 (350 : 7000 = 1 : 20). Le milieu est réparti en boîtes de Roux (50 à 150 centimètres cubes) et stérilisé à 110° pendant vingt minutes.

Il est bon d'être prévenu que la quantité de soude nécessaire pour dissoudre le jaune d'œuf n'est pas toujours la même.

Ce milieu convient à beaucoup d'espèces microbiennes à vitalité brève, particulièrement au *pneumocoque*, au *méningocoque*, au *streptocoque*, au *gonocoque*, au microbe de la *coqueluche* et au *melitensis*.

Le développement du bacille tuberculeux s'effectue dans ce milieu très rapidement, en abondance, en voile très mince et en poussière fine dans la profondeur.

K. — Milieu de Novy-Neal-Ch. Nicolle.

(POUR LEISHMANIA ET TRYPANOSOMES).

Gélose.	14 gr.
NaCl.	6 gr.
Eau.	900 cc

Faire macérer, dans un cristallisoir très propre, la gélose dans l'eau distillée. Après 5 à 6 heures on renouvelle l'eau distillée et on rejette celle-ci après 24 heures de macération totale. On ajoute alors à la gélose gonflée, dans un vase d'Erlemmeyer taré, la quantité d'eau distillée nécessaire pour arriver au poids de 914 grammes, puis 6 grammes de chlorure de sodium. On fait fondre à l'autoclave en stérilisant à 120° pendant 30 minutes, puis on filtre sur ouate hydrophile et on répartit ensuite par 8 centimètres cubes dans des tubes à essai de 15 centimètres de longueur sur 16 millimètres de diamètre, qu'on stérilise et maintient droits pour la solidification.

Conserver des provisions de ces tubes, bien bouchés avec un capuchon de caoutchouc.

Faire fondre au bain-marie cette gélose à 55° environ et introduire dans chaque tube 4 centimètres cubes de sang prélevé aseptiquement à la seringue dans le cœur du lapin. Mélanger sang et gélose fondue, en agitant légèrement sans former de bulles, et laisser faire prise, les tubes étant inclinés.

On garde ces tubes *inclinés* à l'étuve à 37° pendant 2 ou 3 jours, puis on les redresse, on les bouche au caoutchouc et on les conserve à l'obscurité jusqu'à usage.

L. — Milieux additionnés d'hémoglobine.

10 grammes d'hémoglobine du commerce sont dissous dans 90 centimètres cubes d'eau distillée additionnée de 10 centimètres cubes de solution de soude à 10 p. 100. On stérilise à l'autoclave. On ajoute 1 centimètre cube de ce mélange à 9 centimètres cubes environ de milieu nutritif (gélose fondue, etc...).

On peut préparer soi-même l'hémoglobine en recueillant aseptiquement du sang de cheval ou de bœuf dans un bocal contenant 2 volumes d'eau salée physiologique pour 1 volume de sang. On laisse reposer à la glacière pendant 24 heures et on décante pour séparer les globules rouges. Ceux-ci sont additionnés d'une petite quantité d'éther. Par agitation, l'hémolyse se produit très rapidement. On évapore l'éther dans le vide et on filtre, à travers une bougie Chamberland (marque F), la solution d'hémoglobine qui peut être employée telle quelle en mélange, en proportions variables, avec les milieux de culture.

M. — Milieux additionnés d'exsudats ou d'extrait d'organes (Ascite, liquide d'hydrocèle ou de kyste ovarien, exsudats leucocytaires).

Les liquides exsudatiques doivent avoir été recueillis aseptiquement. On les mélange en proportions variables avec les milieux de culture stérilisés. Les exsudats leucocytaires, pleuraux, péritonéaux, etc., dont la stérilité n'est pas certaine, peuvent être mélangés avec parties égales de glycérine à 30° Bé et on les conserve ainsi pendant plusieurs semaines avant de les utiliser. Pour s'en servir ensuite, on les mélange dans la proportion de 0,5 à 1. p. 100 aux milieux de culture liquides ou préalablement liquéfiés et on les maintient à l'étuve à 37° pendant 48 heures avant de les ensemencer.

Milieux à extrait alcoolique de foie.

Le foie de cheval est rapidement lavé à l'eau du robinet, découpé en petits morceaux et broyé finement au mortier de porphyre jusqu'à obtention d'une purée. On ajoute ensuite au foie son poids d'alcool à 90° et l'on continue à

broyer pendant un quart d'heure. La purée alcoolique est placée dans des bocaux à large goulot où elle est agitée deux fois par jour. Au bout de trois jours, on filtre sur papier. Cet extrait alcoolique de foie se conserve très longtemps à la température ordinaire à l'abri de la lumière. L'extrait est ajouté au bouillon ordinaire en voie de préparation, immédiatement avant sa stérilisation. Le milieu ainsi préparé ne renferme donc pas d'alcool qui s'évapore pendant le chauffage. Si l'on veut obtenir des milieux tout à fait limpides, sans précipité, il suffit d'ajouter l'extrait avant la filtration du bouillon. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le bouillon renfermant 10 à 12 p. 100 d'extrait.

L'extrait alcoolique de foie de cheval renferme 0,885 grammes de glucose par litre ; son acidité totale est de 0 gr. 390 p. 1000 ; l'extrait sec est de 0,475 grammes p. 100.

N. — **Milieux vitaminés.**

Recevoir du sang dans un flacon stérile contenant des perles de verre ; agiter pour défibriner ; mesurer la quantité de sang défibriné et étendre de trois à quatre fois le volume avec de l'eau physiologique ; chauffer à 80° pendant 15 minutes. Filtrer sur papier pour retenir les substances précipitées et stériliser par filtration à la bougie.

Ajouter ce liquide aux milieux de culture dans la proportion de 5 à 10 % (XX gouttes dans un tube de bouillon et X gouttes dans un tube de gélose en culot).

O. — **Milieux de cultures anaérobies.**

a) Le procédé le plus pratique pour cultiver les microbes anaérobies en milieux liquides consiste à répartir ces milieux (bouillon par exemple) en tubes ou en ballons et à recouvrir leur surface d'une couche épaisse de 10 à 15 millimètres environ d'huile de vaseline. On stérilise et on laisse refroidir dans l'autoclave fermé. On ensemence à la pipette, après refroidissement, à travers la couche d'huile.

C'est le procédé de choix pour le b. du tétanos (voir chapitre XL).

b) Pour les cultures sous cloche, on peut, soit faire le vide, soit absorber l'oxygène par le mélange suivant :

Acide pyrogallique.	10 gr.
Potasse caustique.	10 gr.
Eau distillée.	100 cc.

Ce mélange doit être préparé et versé dans les vases immédiatement avant la fermeture de ceux-ci.

Il est commode d'avoir, toutes préparées, deux solutions : l'une de potasse caustique à 20 p. 100, l'autre d'acide pyrogallique à 20 p. 100. On les mélange en parties égales dans le récipient dont il s'agit d'absorber l'oxygène.

On peut aussi, très simplement, faire des cultures anaérobies en se servant de deux tubes concentriques : l'un, intérieur, bouché à l'ouate, contient le milieu de culture ensemencé (liquide ou solide) ; dans le tube extérieur on a versé 1 gramme d'acide pyrogallique en poudre. On y ajoute, avec une pipette, 1 centimètre cube de solution à 10 p. 100 de soude caustique et on bouche aussitôt avec un bon bouchon de caoutchouc qu'on recouvre de cire Golaz ou de paraffine fondue.

c) *Substances réductrices susceptibles d'être incorporées aux milieux liquides ou solides (indicateurs de l'absence d'oxygène*) :

Glucose. . . . . 0,5 à 1,5 p. 100 (*Liborius, San Felice, Veillon*).
Sulfo-indigotate de soude à 0,1 p. 100 (*Salomonsen*).
Formiate de soude. . . . 0,3 à 0.5 p. 100 (*Kitasato-Weil*)
Bleu de méthylène, sol. alcool. à 1 p. 100 qq. gtt. jusqu à faible coloration bleue.

d) *Tubes de Veillon* (procédé de choix pour les anaérobies intestinaux) :

On prépare de la gélose, additionnée de 5 à 15 p. 1.000 de glucose et de 1 p. 1.000 de nitrate de potasse [1], que l'on répartit dans de gros tubes à essai (tubes de 2 centimètres

1. Le nitrate de potasse empêche la production de bulles de gaz hydrogène qui fragmenteraient la gélose et gêneraient l'isolement ultérieur des colonies (*Veillon et Mazé*). On peut ajouter au nitrate, comme matière azotée animale, 1 centimètre cube de sérum stérile de cheval ou de lapin, par tube. Cette addition de sérum doit alors être faite après la stérilisation de la gélose glucosée, lorsque celle-ci est refroidie aux environs de 50°.

de diamètre × 20) sur 10 à 12 centimètres de hauteur. On stérilise à l'autoclave, sans dépasser 120°, pendant 20 minutes (pour éviter la caramélisation du glucose) et on solidifie rapidement en position verticale dans un courant d'eau froide.

On ensemence par piqûre profonde. La couche de gélose est assez épaisse pour empêcher l'accès de l'air au milieu et au fond du tube.

Le prélèvement des colonies s'effectue en piquant celles-ci avec une pipette à effilure très fine.

CHAPITRE VI

MILIEUX DE CULTURE PARTICULIERS A QUELQUES ESPÈCES MICROBIENNES

A. — Milieux sans matières albuminoïdes.

a) *Liquide Raulin pour la culture des Aspergillus* :

N° 1	:	Eau.	1.500 cc.
— 2	:	Sucre candi.	70 gr.
— 3	:	Acide tartrique.	4 gr.
— 4	:	Azotate d'ammoniaque. . .	4 gr.
— 5	:	Phosphate d'ammoniaque. .	0 gr. 60
— 6	:	Carbonate de potasse. . . .	0 gr. 40
— 7	:	Carbonate de magnésie. . .	0 gr. 25
— 8	:	Sulfate d'ammoniaque . . .	0 gr. 07
— 9	:	Sulfate de zinc.	0 gr. 07
— 10	:	Sulfate de fer.	0 gr. 07
— 11	:	Silicate de potasse.	0 gr. 07

Stériliser par filtration au Chamberland, à froid, pour ne pas intervertir le saccharose.

On peut avoir, stérilisée d'avance à l'autoclave dans un ballon, une solution de toutes les substances minérales (n° 3 à n° 11) dans 500 centimètres cubes d'eau distillée, et faire dissoudre, au moment de l'usage, 70 grammes de sucre candi dans un litre d'eau qu'on vient de faire bouillir. On mélange à cette solution de sucre la solution minérale stérile et on verse dans une cuvette à photographie en verre ou en porcelaine. Pour la culture de l'*Aspergillus niger* qui s'effectue à la température de 35° environ, on recouvre la cuvette d'une plaque de verre pour réduire l'évaporation.

L'*Aspergillus fumigatus* se cultive à la température de 33° à 35° dans le même liquide, qu'on répartit, stérile et en couche peu épaisse, dans des ballons à fond plat.

b) *Milieu minéral de Pasteur* :

Tartrate d'ammoniaque.	1 gr.
Sucre candi.	10 gr.
Cendres de levures	1 gr.
Eau.	100 cc.

c) *Milieu de Cohn :*

Phosphate monobasique de potassium.	1 ou 2 gr.
Sulfate de magnésie crist. pur. . .	1 gr.
Phosphate tribasique de calcium. .	0 gr. 1
Tartrate d'ammoniaque.	2 gr.
Eau distillée.	200 cc.

d) *Milieu d'Uschinsky :*

Eau.	1.000 cc.
Glycérine.	30 à 40 gr.
Chlorure de sodium pur.	5 à 7 gr.
Chlorure de calcium pur.	0 gr. 1
Sulfate de magnésium.	0,2 à 0,4
Phosphate bibasique de potassium. .	2,0 à 2,5
Lactate d'ammoniaque.	6,0 à 7,0
Asparagine.	3,5

e) *Milieu synthétique de Lasseur pour la culture des microbes fluorescents et particulièrement du Bacillus chlororaphis de l'eau :*

Eau.	100 cc.
Asparagine	0,700
Glycérine.	2,500
Phosphate dipotassique.	0.100
Sulfate de magnésie.	0,500
Chlorure de calcium.	0,040
Sulfate ferreux.	0,010

B. — Milieu de culture pour les microbes phosphorescents.

Poisson de mer (harengs frais ou maquereaux).	500 gr.
Glucose.	10 gr.
Peptone.	10 gr.
Asparagine.	5 gr.
Glycérine.	10 gr.
NaCl	30 gr.
Eau q. s. pour.	1 lit.

Faire bouillir d'abord à feu doux une heure, ou à 100° à l'autoclave (non boulonné), puis jeter sur un linge, s'assurer que le liquide est alcalin au papier de tournesol, filtrer au papier Chardin, répartir en tubes ou en ballons et stériliser à 120° pendant 15 minutes. On peut gélatiner ce bouillon en y ajoutant 10 p. 100 de gélatine. La stérilisation sera alors faite de préférence par chauffage discontinu, 1 heure par jour à 100° pendant 3 jours consécutifs.

C. — Milieux de culture du B. Cyanogenus.
(*Lait bleu*).

Lait.	100 gr.
Glucose.	2 gr.
Lactate de chaux ou d'ammoniaque, stérilisé à part dans 10 cc. d'eau.	1 gr.

Cultiver à 22°. Ou bien :

Bouillon de veau sans peptone.	100 cc.
Glucose.	2 gr.

Le même bouillon gélosé constitue le réactif des diverses races de bacilles. Ensemencé avec le *B. Cyanogenus*, il devient bleuâtre.

D. — Milieux spéciaux divers.

a) *Milieux pour la culture des ferments acétiques :*

Vin rouge ou blanc.	1 partie
Vinaigre de vin filtré au Chamberland. .	1 partie
Eau.	2 parties

ou bien (*Beyerinck*) :

Eau du robinet.	100 cc.
Alcool à 95°.	3 cc.
Phosphate d'ammoniaque.	0 gr. 05
Chlorure de potassium.	0 gr. 01

b) *Milieux pour la culture des ferments lactiques :*

Maltopeptone.	5 gr
Glucose	10 gr.
Carbonate de calcium.	10 gr.
Eau.	200 cc.

Milieu gélatiné pour l'isolement des ferments lactiques :

Petit-lait.	100 cc.
Chlorure de sodium.	0 gr. 05
Peptone.	1 gr.
Gélatine.	10 gr.

c) *Milieu de G. Bertrand et F. Duchacek pour la culture du ferment lactique bulgare en milieu non sucré (pour les usages thérapeutiques)* :

Faire bouillir 30 grammes de touraillons (radicelles d'orge desséchées) pendant 15 minutes dans un litre d'eau additionnée de 1 p. 100 de peptone Chapoteau et de 3 p. 100 de carbonate de calcium précipité.

Répartir en tubes ou ballons et stériliser à l'autoclave à 115°. Dans ce milieu, la bactérie conserve toutes ses propriétés biochimiques.

c) *Milieux pour la culture anaérobie du ferment butyrique* :

Saccharose.	6 gr.
Phosphate d'ammoniaque.	0,1 à 0,2
Carbonate de calcium.	5
Eau.	200 cc.

ou bien :

Eau distillée.	100 cc.
Glucose ou saccharose.	5 gr.
Carbonate de calcium.	3 gr.
Phosphate de soude	0 gr. 05
Sulfate de magnésie.	0 gr. 05
Chlorure de potassium.	0 gr. 05

Pour l'isolement du ferment butyrique, on se sert de ce milieu additionné de 15 p. 100 de gélatine et coulé en tubes inclinés. Les tubes sont maintenus sous une cloche à vide à la température de 20 à 22°.

d) *Milieu de Beyerinck pour la culture des ferments de l'urée* (*Micrococcus ureæ principalement*) :

Eau de robinet.	1 litre .
Urée.	50 gr.
Acétate de soude.	10 gr.
Phosphate neutre de potasse.	0 gr. 25

e) *Milieu de Delden pour la culture des ferments réducteurs des sulfates* :

Eau de robinet.	100 cc.
Phosphate acide de potasse.	0 gr. 05
Lactate de soude	0 gr. 05
Asparagine.	0 gr. 01
Sulfate de magnésie ou de chaux. . . .	0 gr. 01
Sulfate de fer.	traces

f) *Milieu d'Omeliansky pour la culture anaérobie des ferments de la cellulose* :

Eau distillée.	1.000 cc.
Phosphate de potasse.	1 gr.
Sulfate de magnésie.	0 gr. 05
Phosphate d'ammoniaque.	1 gr.
Chlorure de sodium	traces
Cellulose sous la forme de papier Berzélius, lavé et séché.	

Répartir en tubes ou en ballons. Verser sur la surface du liquide une couche d'huile de vaseline et stériliser à l'autoclave.

g) *Milieu de culture pour les teignes* :

Peptone.	20 gr
Gélose.	13 gr.
Eau.	1 litre

Fondre à 120° 1 heure, retirer de l'autoclave et ajouter :

Acide acétique cristallisable.	V gouttes
Glycérine.	20 gr.

Remuer, porter à 100° pendant 20 minutes à l'autoclave non boulonné ; filtrer et répartir en tubes inclinés.

h) *Milieu de culture de Sabouraud pour les bacilles séborrhéiques* :

Ensemencer des comédons sur :

Eau de robinet.	1 litre
Peptone granulée Chassaing.	10 gr.
Glycérine neutre.	40 gr.
Acide acétique cristallisable.	V gouttes
Gélose.	10 gr.

Une culture sur dix environ est pure d'emblée. Les autres sont mélangées de cocci polymorphes qui meurent en un mois, tandis que le micro-bacille sous-jacent survit.

Il faut réensemencer assez abondamment.

CHAPITRE VII

PRINCIPALES MATIÈRES COLORANTES EMPLOYÉES EN TECHNIQUE MICROBIOLOGIQUE — MÉTHODES USUELLES DE COLORATION DES MICROBES ET DES PROTOZOAIRES.

La *coloration des microbes* s'effectue d'après les mêmes principes que celle des fibres végétales et des tissus animaux, c'est-à-dire conformément aux lois physico-chimiques qui régissent les phénomènes d'adhésion moléculaire (ou adsorption) et les phénomènes d'osmose.

Tantôt les substances très complexes qui constituent les corps microbiens fixent les matières colorantes par simple *adhésion* ou « *adsorption* », comme le fait le charbon animal par exemple : tantôt elles se comportent comme des *membranes dialysantes* qui laissent diffuser les colorants vers les colloïdes intracellulaires (albumine, caséine, gélatine ou collagènes, mucine, etc.) sur lesquels ils exercent des actions chimiques extrêmement variables : *coagulation, insolubilisation* ou *laquage, précipitation*, etc.

Et comme, parmi les matières colorantes, les unes sont *acides*, les autres *basiques*, on conçoit que les basiques par exemple tendent à s'unir aux substances acides (séro-albumines, nucléines, acide nucléique, acide métaphosphorique) qui sont les principaux constituants des albuminoïdes, tandis qu'au contraire les couleurs acides satureront leur acidité aux dépens des sels alcalino-terreux ou ammoniacaux qui entrent pour une large part dans la composition de certains tissus (fibrine, stroma globulaire, etc.).

Les *couleurs basiques*, en raison de leur affinité élective pour les protoplasmas microbiens riches en nucléine et en acide métaphosphorique, sont donc les plus utiles en microbiologie.

Les *couleurs acides* rendent cependant aussi beaucoup de services comme colorants de contraste, ou de fond, permettant de mettre en valeur les colorations électives.

Les *couleurs d'aniline* employées en technique microbiologique portent les noms indiqués sur les catalogues de leurs fabricants et il arrive souvent que le même produit, chimiquement défini. est désigné, suivant qu'il est vendu par telle ou telle maison, sous une dénomination différente [1].

I. Couleurs d'aniline.

A. — *COLORANTS BASIQUES*

a) *Fuchsine* (chlorhydrate, acétate ou sulfate de rosaniline, dérivé du triphénylméthane). Divers noms commerciaux : rubine, roséine, fuchsine-diamant, rouge magenta, rouge solférino.

Excellent colorant nucléaire. Très soluble dans l'alcool. L'eau n'en dissout que 0,3 p. 100.

Solution de Ziehl. — Triturer dans un mortier :

Fuchsine.	1 gr.
Acide phénique cristallisé.	5 gr.
Alcool à 95°.	10 cc.

Reprendre dans le mortier par :

Eau distillée.	90 cc.

Filtrer.

Après coloration par le Ziehl on peut *différencier*, c'est-à-dire éliminer l'excès de colorant qui n'est pas fixé sur les éléments électifs, soit par l'alcool à 95°, soit par l'alcool aniliné (10 volumes d'aniline pour 90 volumes d'alcool absolu), soit par le gaïacol (solution à 10 p. 100 dans l'alcool à 90°).

b) *Safranine* (chlorhydrate de tolusafranine ou rose d'aniline). Peu soluble dans l'eau (0,6 p. 100), très soluble dans l'alcool. Excellent colorant nucléaire. Il est avantageux de la conserver en solution alcoolique saturée et de diluer quelques gouttes dans l'eau saturée d'aniline au moment de s'en

1. Les colorants sont actuellement préparés dans des usines françaises : Société des matières colorantes de Saint-Denis. Produit RAL des établissements Kuhlmann. Les produits RAL sont spécialement étudiés pour les recherches de laboratoires. Ils ont été mis au point à l'Institut Pasteur qui continue à les contrôler. On les trouve à la Société Kuhlmann, 16, rue de Miromesnil, à Paris, et aux établissements Poulenc frères, 122, boulevard Saint-Germain, chez Cogit, Jouan, etc.

servir. On différencie avec l'alcool à 95° ou avec l'alcool acidulé par 0,5 p. 100 d'acide chlorhydrique.

Formule de Babès (recommandée) : préparer d'avance, dans un grand flacon, de l'eau d'aniline saturée (une eau d'aniline ancienne donne, en effet, de meilleurs résultats qu'une eau préparée extemporanément). On la filtre, au moment de l'emploi, sur un filtre mouillé et on la sature de safranine.

c) *Bleu de méthylène* (thiazine, chlorhydrate ou chlorozincate de tétraméthyl-thionine). Marque RAL spécialement recommandée. C'est un colorant puissant, non toxique pour les éléments cellulaires, vivants, à forte action élective sur les noyaux, les granulations basophiles du sang, la substance protoplasmique basophile des leucocytes, des hématies, des plaquettes, la mucine et les granules de Nissl des cellules nerveuses.

Il est très soluble dans l'eau et l'alcool. Les solutions mères alcooliques saturées se conservent bien. Son pouvoir tinctorial est plus considérable en solution alcaline.

Bleu de Löffler :

Solution alcoolique saturée de bleu. . .	1 vol.
Solution aqueuse de potasse à 1 p. 10.000.	2 vol.

Ou bien, au lieu de la solution de potasse, eau saturée d'aniline et filtrée (l'aniline est soluble à 3 p. 100 dans l'eau). Les préparations colorées au bleu de Löffler doivent être différenciées par lavage rapide à l'eau acidulée par 0, 5 p. 100 d'acide acétique, puis par une solution aqueuse de 10 grammes de tanin (préparé à l'éther) dans 100 cc. d'eau (8 à 10 secondes).

Le bleu de méthylène pur n'est pas polychromatique. Un traitement chimique en milieu alcalin le transforme très facilement en dérivés d'oxydation (azur et violet de méthyle). Ces deux colorants, ou leur mélange avec du bleu de méthylène inattaqué, constituent des produits permettant d'obtenir des réactions métachromatiques très belles et des différenciations parfaites entre les éléments cellulaires.

Ce processus d'oxydation en milieu alcalin intervient dans la préparation des bleus Borrel à l'argent, de Löffler à la potasse, des bleus boratés, des azurs de Giemsa, des préparations de Tribondeau à l'ammoniaque, etc.

Préparation du bleu Borrel :

Dans une fiole de 150 cc. environ on met 3 ou 4 grammes de cristaux d'azotate d'argent et 50 à 60 cc. d'eau distillée. Quand les cristaux sont dissous on remplit la fiole avec une solution de soude à 10 p. 100 et on agite. Il se forme un précipité d'oxyde d'argent qu'on décante et lave à plusieurs reprises à l'eau distillée, jusqu'à ce que le liquide qui s'écoule ne bleuisse plus le papier de tournesol. On verse alors, sur l'oxyde d'argent, une solution aqueuse à 1 p. 100 de bleu *médicinal* RAL. Le bleu de méthylène, ainsi oxydé, forme un *mélange d'azur de méthylène* et *de violet de méthylène*. On laisse en contact, pendant trois semaines au moins, en agitant à plusieurs reprises, et on filtre ; ou bien, si l'on est pressé, on mûrit immédiatement la solution en la chauffant pendant 45 minutes, au moins, à 120°, à l'autoclave. Ce liquide colorant est très stable. Il convient particulièrement à la coloration du sang et de ses parasites.

Azur II (*de Giemsa*) :

Mélange de chlorhydrate d'azur de méthylène (azur I) et de chlorhydrate de bleu méthylène. Excellent colorant qu'on peut substituer avantageusement au bleu de Löffler :

Solutions mères :

A. —	Azur II.	1 gr.
	Eau phéniquée à 5 p. 1.000. . . .	100 cc
B —	Carbonate de sodium à 1 p. 100.	

On dilue, au moment de s'en servir, 1 cc. de solution *A* dans 10 ou 20 cc. d'eau distillée (jusqu'à obtention d'une solution transparente). A 10 cc. de cette solution on ajoute 5 à 10 gouttes de *B*. Colorer 10 à 15 secondes. Laver à l'eau et sécher.

Pour les usages courants du laboratoire, on emploie géné ralement les solutions de *bleu phéniqué* de *Kühne* ou *boraté* de *Kolle*, qui se conservent bien :

Bleu phéniqué de Kühne :

On broie dans un mortier :

Bleu de méthylène médicinal.	2 gr.
Acide phénique cristallisé.	2 gr.
Alcool à 95°.	10 cc.

On verse dans un flacon bouché à l'émeri et on laisse la couleur se dissoudre lentement. Après 24 heures, on ajoute :

Eau distillée.	100 cc.

On agite et on filtre.

Bleu boraté de Kolle :

Solution de 2 grammes de bleu médicinal dans une solution aqueuse de borax à 5 p. 100. Les colorations sont meilleures avec un liquide préparé depuis quelques jours.

d) Le *bleu polychrome de Unna* (marque RAL) est une préparation spéciale très métachromatique, c'est-à-dire qui permet de colorer en nuances caractéristiques les différents éléments chromotropes des cellules ou des tissus (par exemple la substance amyloïde en violet, la mucine et les tissus cartilagineux en rouge). Après son emploi, on doit laver rapidement et différencier par l'*éther glycérique de Unna* étendu de 5 parties d'eau, puis laver à fond à l'eau distillée et déshydrater à l'alcool absolu.

e) La *thionine* (*violet de Lauth*) possède des propriétés métachromatiques analogues. Son emploi est très commode avec la formule de Maurice Nicolle :

Thionine	0 gr. 5
Alcool absolu.	10 cc.
Acide phénique cristallisé.	3 gr.

Triturer et laisser dissoudre 24 heures dans un flacon, puis ajouter :

Eau distillée.	90 cc.

et filtrer.

Les colorations sont meilleures avec les solutions vieilles d'au moins 3 semaines. Pour différencier, on lave à l'alcool à 80° ou 90°.

Le vieillissement étant assez inconstant, nous recommandons le mode opératoire suivant, qui permet d'obtenir une solution parfaite, immédiatement utilisable :

Dissoudre la thionine à saturation dans l'eau distillée.

Précipiter par une solution de soude caustique à 10 p. 100. Recueillir le précipité sur un filtre et le laver à l'eau distillée jusqu'à ce que le liquide sortant du filtre ne soit plus alcalin.

Reporter le précipité dans un flacon et l'y dissoudre à saturation dans eau phéniquée à 2 p. 100. Laisser reposer 24 heures.

La solution est dès lors prête à l'usage.

f) Le *bleu de toluidine* (chlorozincate de diméthyltoluthionine) est également très utilisé et offre sensiblement les mêmes avantages que la thionine. On peut l'employer pour les colorations vitales, comme le bleu de méthylène, parce qu'il n'est pas toxique. Pour les préparations de frottis fixés ou de coupes, on se sert de solutions à 1 ou 2 p. 100 dans l'eau phéniquée, ou boratée à 1 p. 100. On différencie avec une solution aqueuse de tanin à 10 p. 100 ou avec l'alcool absolu additionné de 1 p. 100 d'acide oxalique.

g) *Violet de méthyle* ou *violet de Paris*, violet 5 ou 6 B, mélange de chlorhydrates de tétra, penta et hémaméthylpararosaniline. Très soluble dans l'eau, l'alcool, le chloroforme.

Employé en solution dans l'eau saturée d'aniline (10 cc. de solution alcoolique saturée, dans 100 cc.) avec différenciation par l'alcool ou par l'iode (solution de Lugol) et l'alcool Ou bien en solution acétique :

Solution saturée dans l'alcool à 96°. . .	10 cc.
Eau distillée	20 cc.
Acide acétique cristallisable.	2 cc. 5

Colore le protoplasma cellulaire en bleu, la substance amyloïde en rouge.

h) *Violet de gentiane*.

Mélange de violet de méthyle et de violet cristallisé (chlorhydrate d'hexaméthyl-pararosaniline avec un peu de dextrine).

Pour les frottis, exsudats, cultures et pour la réaction de Gram, on emploie la solution suivante, qui se conserve bien :

Solution alcoolique saturée de violet de gentiane.	10 cc
Eau phéniquée à 1 p. 100.	100 cc.

Pour les coupes à différencier par le Gram, la formule d'Ehrlich est meilleure :

Violet de gentiane.	1 gr.
Alcool.	15 cc.
Eau saturée d'aniline.	85 cc.

i) *Violet benzylé* (ou *violet méthyl 5B, 6B, 7B, violet 6B*).
Mêmes techniques. Coloration plus bleue qu'avec le violet de méthyle.

j) *Violet cristallisé* (chlorhydrate d'hexaméthyl-pararosaniline). Très soluble dans l'eau et l'alcool.

On peut employer une solution à 1 p. 30 dans l'alcool à 95° pour colorer le bacille tuberculeux par exemple, et différencier par l'acide azotique à 0.1 p. 100, puis rapidement par l'alcool.

On l'utilise aussi pour la préparation du milieu de Drigalski-Conradi qui sert à isoler le bacille typhique (voir chap. XXXIII).

k) *Vert de méthyle* (vert à l'iode).

Soluble dans l'alcool et l'eau, insoluble dans l'alcool amylique et le chloroforme.

Excellent colorant pour la chromatine nucléaire ; colore faiblement les microbes. On l'emploie en solution saturée dans l'alcool absolu, à laquelle on ajoute 0,5 p. 100 d'acide acétique cristallisable. Il faut ensuite différencier et déshydrater les préparations par l'alcool absolu additionné de 1 p. 100 d'acide acétique.

l) Le *vert Malachite* (chlorozincate, oxalate ou sulfate de tétraméthyldiamidotriphényl-carbinol, vert de Chine, vert diamant, malachite) est d'un usage courant. On l'emploie à l'état de chlorozincate pour la différenciation du bacille typhique selon la méthode de Löffler.

m) La *pyronine* est souvent utilisée comme couleur basique pour la préparation de mélanges neutres. Ses solutions aqueuses sont rouges et fluorescentes.

On l'associe parfois au vert méthyle (*Pappenheim*) pour colorer les éléments basophiles.

n) *Vésuvine* (colorant azoïque, brun de phénylène ou de crésylène, brun de Bismarck.) Colorant brun qu'on doit dissoudre dans l'eau à l'ébullition et qu'on filtre après refroidissement. S'emploie en solution aqueuse à 1 p. 100 pour teindre en brun les noyaux, les cartilages, la mucine et aussi les microbes. On différencie par l'alcool absolu. Surtout employé pour les doubles colorations et parfois pour les colorations vitales.

o) *Rouge neutre* (marque RAL). Très soluble dans l'eau qu'il teinte en rose légèrement violacé. Avec une faible trace

d'acide organique il devient rouge fuchsine et, avec les alcalis, jaune brun. La faible teneur en alcali des eaux de source suffit à le faire virer au jaune brun.

Ce réactif entre dans la composition de beaucoup de milieux de culture spéciaux. Il colore, comme les couleurs basiques, les noyaux et les substances basophiles. Il teint en rouge le protoplasma des leucocytes et des lymphocytes, les granules basophiles des mononucléaires, les granules de Nissl, la mucine.

On l'emploie également en solution à 0,5 p. 100 dans l'eau salée physiologique pour les colorations vitales du sang. Il colore en rouge les cellules et tissus vivants. Il n'est pas toxique, de sorte qu'on peut l'injecter dans l'organisme des petits animaux.

* * *

B. — *COLORANTS DIRECTS*

Rouge congo. Azoïque (benzidine tétrazotée sur 2 molécules de naphtionate de sodium).

Employé pour les celluloses et les colorations vitales. Solution à 0,5 p. 100 dans l'eau. Très sensible aux acides qui le font virer au bleu.

Benzo-bleu brillant 6 B ou *bleu pur direct* 6 *B* (dianisidine tétrazotée sur 2 molécules acide SS).

Non toxique. Employé pour les colorations vitales. Très soluble dans l'eau.

C. — *COLORANTS DES GRAISSES*

Electifs en raison de leur solubilité dans les corps gras :

a) *Soudan III* ou écarlate au gras *A* (amidoazobenzène diazoté sur bétanaphtol).

Colorant diazoïque, insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool et les corps gras. Est utilisé pour colorer les particules graisseuses. (Soudan III BX et écarlate R pour graisses ; marque RAL recommandée.)

Utilisé aussi pour la coloration du liège en histologie végétale.

b) *Bleu d'indophénol* (par action de la nitrosodiméthylaniline sur alpha-naphtol). Produit insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool et les graisses.

*
* *

D. — *COLORANTS ACIDES*

(Sels à base incolore, acide coloré, colorants de fond électifs.)

a) *Eosine*. Il en existe plusieurs variétés, qui toutes sont des sels alcalins de la tétrabromo-fluorescéine. La meilleure est l'éosine marque RAL n° 275 pour histologie, soluble dans l'eau et dans l'alcool. C'est une couleur acide bibasique qui teint fortement en rouge vermillon les éléments oxyphiles des cellules des tissus. On l'emploie en solution aqueuse à 0,5 p. 100 dans l'alcool à 70°. Son action est rapide. On élimine l'excès de couleur par lavages plus ou moins prolongés à l'eau ou à l'alcool faible. Elle est d'un usage courant pour les doubles colorations et entre dans la composition de plusieurs mélanges d'une utilisation très commode pour la coloration du sang et des parasites sanguicoles (éosine-bleu, éosine-vert, Giemsa, Romanowsky, etc.) ; dans ce dernier cas, employer l'éosine dite *extra cristallisée* RAL.

b) *Orange G* (aniline diazotée sur sel G). C'est un des meilleurs colorants plasmatiques. On l'emploie en solution aqueuse à 0,5 p. 100 ou même en solution plus faible. Son action est très rapide.

c) *Fuchsine acide* (sel de sodium de la fuchsine trisulfonée, rubine S ou amaranthe G ; rubine S). — Très soluble dans l'eau (20 p. 100) ; beaucoup moins dans l'alcool. Bon colorant plasmatique et de contraste en solution aqueuse à 0,1 p. 100 dans l'alcool dilué. Son action est intense et rapide. On différencie avec l'eau picriquée saturée ou avec l'alcool acidulé par l'acide acétique.

d) *Acide picrique* (trinitrophénol, colorant nitré). S'emploie en solution aqueuse ou alcoolique saturée.

*
* *

E. — COLORANTS COMPOSÉS

Ces colorants, en mélanges plus ou moins neutralisés, de telle sorte que chaque couleur garde pourtant ses propriétés électives, sont d'un emploi commode, surtout pour l'étude du sang. Leur préparation est assez délicate. Il est avantageux de les acheter tout faits. Les solutions sont inaltérables, pourvu qu'on les tienne en flacons bien fermés, à l'abri de la lumière.

a) *Mélange d'Ehrlich-Biondi-Heidenhain.*

On prépare séparément des solutions aqueuses saturées de *fuchsine acide* (Rubine S.), *orange G.* et *vert méthyle.* On les mélange dans les proportions suivantes pour faire la solution mère :

Fuchsine acide	4 cc.
Orange G.	7 cc.
Vert méthyle.	8 cc.

Pour l'usage, on verse 1 centimètre cube de cette solution mère dans 50 centimètres cubes d'eau distillée.

L'action est lente (24 heures). On porte ensuite les préparations pendant 2 heures dans de l'alcool additionné de 2 p. 100 d'acide acétique, puis on déshydrate par l'alcool absolu acétique (acide acétique 1 centimètre cube p. 100 centimètres cubes d'alcool absolu), enfin on passe au xylol. La chromatine est ainsi colorée en bleu, le protoplasma en rouge.

b) *Triacide d'Ehrlich.* Composé des mêmes colorants que le précédent, mais en proportions différentes :

Solution saturée d'orange G.	30 cc.
Solution saturée de fuchsine acide. . . .	6 cc
Eau distillée.	15 cc.
Alcool.	15 cc.

On agite, puis on ajoute :

Solution saturée de vert méthylène. . .	12 cc.
Alcool.	10 cc.
Glycérine	10 cc.

Même différenciation par l'alcool iodé acétique.

c) *Colorant de Leishman.* Sur la lame séchée, non fixée, verser un nombre de gouttes (8 à 10) suffisant pour recouvrir le frottis. Couvrir la lame, pour éviter l'évaporation de l'alcool, avec le couvercle d'une boîte de Pétri, ou la placer dans une boîte de Laveran Faire agir 30 secondes à 1 minute. Ajouter sur la lame un nombre de gouttes d'eau distillée neutralisée[1] double du nombre de gouttes de colorant. Agiter pour mélanger. Laisser colorer 5 à 10 minutes à l'eau de source ou à l'eau distillée.

Le colorant (marque RAL) est livré en solution toute prête ou en poudre. Pour préparer le colorant avec la poudre, mettre cette dernière en solution dans l'alcool à 99° 5 (pur et neutre) à raison de 2 gr. 5 par litre. Faire la solution à froid ou à l'étuve à 37° en agitant de temps en temps. Filtrer après 48 heures.

d) *Colorant de May Grunwald* (marque RAL.) Eosinate de bleu de méthylène. Verser sur le frottis non fixé 10 gouttes de liquide de May Grunwald, couvrir comme dans la technique de Leishmann. Après 2 ou 3 minutes, ajouter 40 gouttes d'eau distillée neutralisée. Bien mélanger, laisser agir 1 ou 2 minutes, puis laver à l'eau distillée.

Ce colorant n'est pas propre à donner seul une coloration convenable des frottis. Il est destiné à servir de premier temps à la méthode panoptique de Pappenheim. Il sert à fixer la préparation et à mieux mettre en évidence les éléments acidophiles et les granulations neutrophiles.

Il est vendu en solution prête pour l'emploi, ou en poudre. Dissoudre cette poudre dans l'alcool méthylique pur, à la dose de 2 gr. 5 par litre.

e) *Colorant de Wright* (marque RAL.) Même technique que pour le colorant de Leishman.

1. *La mauvaise qualité de l'eau distillée est la cause la plus fréquente d'insuccès dans tous les procédés de coloration dérivés de la méthode de Romanowsky.* Elle doit être *parfaitement neutre*, c'est-à-dire avoir une concentration en ions hydrogène de pH7. Or, l'eau distillée est généralement acide. Voici un procédé simple de neutralisation indiqué par *Ponselle* : un tube à essai d'environ 16 millimètres de diamètre, très propre et rincé à l'eau distillée, porte un trait au diamant ou au crayon gras à 10 centimètres cubes. On verse de l'eau distillée jusqu'au trait, on y fait tomber 4 gouttes de bromo-crésol pourpre en solution aqueuse à 0,04 p. 100 et on agite. Le liquide prend généralement une teinte vert jaune ; on verse alors goutte à goutte, avec une pipette effilée, en agitant après chaque goutte, une solution 1/100 normale de carbonate de soude jusqu'à ce qu'on obtienne une teinte violette. Cette eau est employée pour diluer les colorants avec l'indicateur qu'elle contient.

f) *Colorant de Giemsa.* Fixer la lame préalablement avec de l'alcool méthylique ou avec le colorant de May Grunwald (indiqué ci-dessus). Préparer dans une large éprouvette, ou dans une boîte de Laveran, une dilution de colorant de Giemsa dans l'eau distillée neutralisée à raison de :

Eau distillée	10 cc
Colorant de Giemsa.	0 cc. 5

Plonger la lame, sans l'avoir séchée, dans la solution de Giemsa diluée, laisser colorer 10 minutes au minimum, laver à l'eau.

La fixation préalable de la lame peut être faite en se servant du colorant de Leishman. On fixe 30 secondes à 1 minute par quelques gouttes de colorant de Leishman pur. Au bout de ce temps on égoutte l'excès de colorant et, sans laver, on plonge dans la solution diluée. Cette méthode remplace la nouvelle méthode rapide de Giemsa et la solution de Leishman est employée comme le « Farbfixierenlösung ». Elle donne d'excellents résultats avec les protozoaires.

Le colorant de Giemsa se vend sous deux marques :

Marque *R*, donne des colorations intenses, recommandée pour les colorations rapides.

Marque *L*, recommandée pour les colorations lentes ; il précipite moins rapidement que le colorant marque *R*.

Le colorant marque *L* est aussi vendu en poudre, ce qui est avantageux pour les transports ; cette poudre est mise en solution à raison de 0 gr. 76 dans un mélange de :

Alcool méthylique	75 gr.
Glycérine	25 gr.

Le mélange est mis à l'étuve à 37° et agité fréquemment. Filtrer après 48 heures.

g) *Panchrome de Laveran* (bleu de méthylène, bleu de toluidine, azur et violet de méthylène, éosine). Ce colorant peut être employé en dilution de 1/2 centimètre cube dans 10 centimètres cubes d'eau distillée neutralisée, de la même façon que le colorant de Giemsa, après fixation du frottis par un des procédés décrits.

Il peut aussi être employé seul, réalisant à la fois la fixation et la coloration de la lame.

Dans ce dernier cas, placer la lame à plat dans une boîte

de Laveran, verser sur le frottis 1/2 centimètre cube du colorant, recouvrir, laisser agir comme fixateur pendant 3 minutes, ajouter 10 centimètres cubes d'eau distillée, mélanger, laisser colorer 10 à 20 minutes au moins (1/4 d'heure pour les protozoaires).

h) *Panchrome de Pappenheim.*

1° Fixer le frottis à l'alcool méthylique ou avec le colorant de May Grünwald.

2° Egoutter la lame et la plonger, sans la sécher, dans une dilution du panchrome de Pappenheim préalablement préparée à raison de :

Panchrome de Pappenheim.	1/2 cc.
Eau distillée neutralisée.	10 cc.

Laisser colorer 15 à 20 minutes. Laver et sécher.

*
* *

II. Colorants non anilinés, électifs des noyaux cellulaires.

A. — HÉMATÉINE ET HÉMATOXYLINE

a) *Hématéine alunée de Mayer* (colorant nucléaire).

Eau.	1.000 cc.
Alun de potasse.	50 gr.

Chauffer jusqu'à dissolution de l'alun, puis ajouter :

Hématéine.	1 gr. dissoute dans :
Alcool absolu.	50 cc.

Mélanger, laisser refroidir, filtrer. Laisser vieillir avant l'usage, mais pas plus d'un mois, car le mélange rougit à la longue et colore bien moins. On peut garder séparément les deux solutions.

b) *Hématoxyline Delafield.*

A 400 grammes d'eau saturée d'alun ammoniacal, on ajoute 4 grammes d'hématoxyline cristallisée, dissoute dans 25 centimètres cubes d'alcool absolu. On laisse reposer à la lumière et à l'air pendant trois jours dans une capsule. On filtre et on ajoute 100 grammes de glycérine et 100 grammes d'alcool méthylique. On abandonne au repos pendant plusieurs

jours dans un flacon bouché. Quand la solution est devenue très foncée, on filtre de nouveau et on répartit en plusieurs flacons bouchés.

c) *Hématoxyline de Weigert* (laque cuprique).

On mordance les coupes par immersion pendant 30 minutes dans une solution d'acétate de cuivre à 1 p. 100. On colore par :

Hématoxyline de Heidenhain.	0 gr. 50
Eau	100 cc.

Puis on différencie par la solution suivante :

Borate de soude.	2 gr.
Ferrocyanure de potassium.	2 gr. 50
Eau distillée.	200 cc.

Si les coupes sont surcolorées, on les passe rapidement dans l'alcool chlorhydrique :

Alcool à 70°.	1 litre
HCl pur.	XXXIII gtt.

Puis on lave à l'eau distillée, déshydrate, etc.

d) *Hématoxyline au fer* (laque ferrique).

Mordancer les coupes sur lame pendant 30 minutes à 24 heures dans la solution suivante :

Alun de fer ammoniacal (sulfate double d'ammoniaque et de sesquioxyde de fer).	1 à 3 gr.
Eau distillée.	100 cc.

Laver rapidement, puis colorer pendant 24 heures par une solution à 0, 5 p. 100 d'hématoxyline de Heidenhain. Quand la teinte est uniformément noire, on rince à l'eau et on différencie doucement et plus ou moins longtemps par la solution d'alun de fer ammoniacal, jusqu'à ce que les noyaux et centrosomes apparaissent au microscope en bleu noir. On arrête la décoloration par lavage à l'eau lorsqu'on la juge suffisante.

B. — *CARMIN* (colorant nucléaire, réactif de la chromatine).

a) *Carmin chlorhydrique*. Mettre dans une capsule de porcelaine 1 gramme de carmin. Ajouter peu à peu le mélange :

Acide chlorhydrique.	ãã 2 cc.
Eau distillée.	

en agitant avec une baguette de verre jusqu'à formation d'une bouillie homogène violacée. Laisser au repos 1 à 2 heures, puis ajouter :

Alcool à 95°	200 cc.

Verser dans un ballon à fond rond bouché à l'ouate, taré et évaporer jusqu'à réduction de moitié. Eviter l'inflammation des vapeurs sortant du ballon. Répartir ensuite en flacons bouchés à l'émeri pour conserver.

b) *Carmin de Orth.*

Sol. saturée à froid de carbonate de lithine.	100 cc.
Carmin.	2 gr. 50

Pour donner l'élection, traiter la coupe (après coloration) 15 à 30 secondes par :

Acide chlorhydrique	0 cc. 5
Eau	50 cc.

Picrocarmin de Orth.

Carmin de Orth, lithiné.	1 vol.

On mélange :

Eau picriquée saturée.	1 à 2 vol.

Après coloration, les coupes sont portées dans le fixateur suivant :

Alcool absolu.	70 cc.
Eau picriquée saturée.	30 cc.
HCl pur	0 gr. 5

c) *Picrocarmin de Ranvier.* Dissoudre du carmin à saturation dans de l'ammoniaque et verser dans une solution aqueuse d'acide picrique saturée.

Chauffer doucement au bain-marie dans une capsule pour évaporer jusqu'à réduction aux 4/5 du volume primitif (donc évaporation 1/5 en poids). Après refroidissement, filtrer sur papier et évaporer à siccité. Le résidu d'évaporation est le picrocarmin qu'on peut conserver en poudre et utiliser ensuite en solution aqueuse à 1 p. 100. Colore en rouge les noyaux, en orange le protoplasma.

d) *Picrocarmin de Jensen.*

1° Carminate de magnésium (P. Mayer) : dissoudre 1 gram-

me de carmin et 0 gr. 1 d'oxyde de magnésium dans 50 centimètres cubes d'eau distillée, faire bouillir pendant 5 minutes. Après refroidissement, filtration, addition de 0 cc. 5 d'acide phénique.

2° Picrate de magnésium (P. Mayer) : verser 0 gr. 5 d'acide picrique et 0 gr. 5 d'oxyde de magnésium dans 50 centimètres cubes d'eau distillée. Faire bouillir pendant 5 minutes, laisser refroidir et filtrer.

3° Solution à 1 p. 100 d'acide picrique dans l'eau distillée. On mêle alors 1 avec 2 et on ajoute lentement 10 centimètres cubes de la solution d'acide picrique en agitant le mélange. Il se forme un liquide colorant tout à fait limpide, d'un rouge foncé, qui se conserve pendant des mois.

Les noyaux sont colorés en rouge, le protoplasma en orange, les muscles et le sang en jaune et le tissu conjonctif en rose.

C. — *ENCRE DE CHINE, OU DE BURRI (marque RAL)*

Encre de Chine spéciale, très commode pour rechercher les tréponèmes et les spirilles sans coloration (voir plus loin, même chapitre F).

Au lieu de l'encre RAL on peut employer dans les mêmes conditions l'encre américaine de Higgins.

*
* *

III. Méthodes usuelles de coloration des microbes.

A. — *MÉTHODES DE COLORATION SIMPLE DE MAURICE NICOLLE*

Colorer 1 minute avec la solution alcaline de bleu de méthylène (bleu de Löffler)

Ne pas laver. Différencier par lavage rapide avec une solution à 0 gr. 5 d'acide acétique cristallisable pour 100 d'eau distillée. Verser sur la préparation quelques gouttes d'une solution aqueuse à 10 % de tanin à l'éther, laisser en contact 8 à 10 secondes.

Laver à l'eau distillée, essorer, sécher, éclaircir avec une goutte de xylol et monter au baume de Canada. On examine

directement la préparation séchée dans une goutte d'huile à immersion. Ou bien, colorer 1 minute avec :

Solution alcoolique saturée de thionine. .	10 cc.
Solution d'acide phénique à 1 p. 100 . .	100 cc.

Laver à l'eau distillée 1/2 à 1 minute. Essorer, passer à l'alcool absolu très rapidement pour déshydrater, éclaircir, etc.

B — *COLORATION DIFFÉRENTIELLE DES MICROBES*

a) *Méthode de Gram.*

1° Pour les frottis, exsudats ou cultures.

Colorer 2 minutes par la solution de violet de gentiane phéniquée (ou par les violets 5 ou 6 B, penta ou hexaméthylés, ou par le bleu Victoria, à l'exclusion de tout autre colorant).

Sans laver, verser sur la préparation la solution suivante (solution de Lugol-M. Nicolle) qu'on renouvelle 2 ou 3 fois en 2 minutes :

Solution de Lugol (forte) :

Iode.	1 gr.
Iodure de potassium.	2 gr.
Eau distillée.	200 cc

Il se forme avec certains éléments chromatiques une combinaison (iodopararosaniline) insoluble dans l'alcool.

Décolorer à l'alcool à 95°, 10 secondes environ, laver à l'eau. Recolorer 30 secondes par la safranine. Laver à l'eau : essorer ; sécher ; xylol. Examiner dans une goutte d'huile à immersion ou monter au baume de Canada au xylol.

2° Pour les coupes :

Colorer 5 à 30 minutes dans la solution de violet de gentiane phéniquée.

Traiter 2 minutes (sans laver) par la solution de Lugol à l'iode, qu'on renouvelle jusqu'à ce que la décoloration soit complète. Laver à l'eau. Recolorer à la vésuvine (solution aqueuse à 1 p. 100) ou par le picrocarmin de Ranvier (solution aqueuse à 1 p. 100). Passer dans l'alcool faible à 60 p. 100. Laver à l'eau. Sécher. Xylol. Baume.

b) *Méthode de Gram-Nicolle* (recommandable).

1° Pour les frottis, exsudats, cultures :

Colorer 1 à 5 minutes dans la solution suivante, en chauffant doucement au-dessus de la veilleuse d'un bec Bunsen :

Solution alcoolique de violet de gentiane .	10 cc.
Eau phéniquée à 1 p. 100.	100 cc.

Sans laver, verser sur la préparation quelques gouttes de solution de Lugol, qu'on renouvelle 2 ou 3 fois en 4 ou 6 secondes. Décolorer 8 à 10 secondes par l'alcool-acétone :

Alcool absolu.	3 vol.
Acétone.	1 vol.

Laver à l'eau. Recolorer 30 secondes par la solution aqueuse de safranine ou par le bleu de méthylène. Laver à l'eau. Essorer, sécher, etc.

2° Pour les coupes :

Colorer d'abord pendant 30 à 60 secondes par la solution suivante :

Carmin lithiné de Orth.	5 vol.
Alcool à 95°.	1 vol.

Sans laver, traiter 5 minutes par la solution de violet de gentiane phéniquée (comme en *a*), puis solution iodée de Lugol 4 à 6 secondes. Décolorer 8 à 10 secondes par alcool-acétone (1 partie d'acétone pour 2 d'alcool absolu). Traiter 1 à 5 secondes par l'alcool absolu picriqué (saturé) jusqu'à ce que la couleur devienne jaune verdâtre. Laver à l'alcool absolu. Sécher, etc.

c) *Méthode de Gram-Claudius.*

Colorer les coupes pendant 10 à 15 minutes par le carmin de Orth alcoolisé, comme ci-dessus, puis laver à l'eau distillée.

Colorer 1 à 2 minutes dans une solution aqueuse de violet de méthyle à 1 p. 100, ou de violet de gentiane phéniqué.

Laver à l'eau, essorer.

Décolorer par le chloroforme, puis par l'essence de girofle, jusqu'à ce que la coupe ait pris une teinte rose. Eclaircir au xylol et monter au baume. Ou bien, pour les frottis : sécher au papier buvard, puis à l'étuve ; examiner dans une goutte d'huile à immersion. (Outre les microbes qui

prennent le Gram, on peut colorer ainsi le bacille du charbon symptomatique et le vibrion septique).

d) *Méthode de Romanowski* (modifiée par *A. Plehn*).

On laisse mûrir quelques semaines une solution aqueuse à 2. p. 100 de bleu de méthylène médicinal (exempt de $ZnCl^2$) à laquelle on a ajouté 5 p. 100 de borate de soude. Mélanger 2 parties de cette solution avec une partie de solution aqueuse d'éosine à 1 p. 100. Quinze à trente secondes après que le mélange bien homogène a été fait, et qu'il s'est formé une pellicule irisée à la surface, on prélève du liquide en introduisant l'extrémité d'une pipette sous la pellicule, et on le transporte dans une boîte de Pétri ou un godet contenant, face retournée en dessous, la préparation à colorer. Au bout de 2 minutes, la coloration est terminée.

On lave à l'eau. On passe quelques secondes dans l'alcool à 90° et on revient rapidement à l'eau. Enfin on sèche au buvard et on monte dans l'huile de cèdre.

Pour les coupes, ce procédé est bon, mais seulement si elles n'ont pas plus de 5 microns d'épaisseur. Il faut les laisser sécher à l'air avant de monter dans le baume, au lieu de passer à l'alcool et au xylol.

e) *Méthode de Giemsa* (pour les coupes et pour les frottis d'organes).

Plonger la coupe pendant 10 minutes dans la solution suivante :

Iodure de potassium.	2 gr.
Solution de Lugol.	3 cc.
Eau distillée.	100 cc.

Laver à l'eau rapidement. Traiter pendant 10 minutes par une solution aqueuse d'hyposulfite de soude à 0,5 p. 100. Laver 5 minutes dans l'eau courante.

Colorer 2 à 12 minutes à la température de 37° à l'étuve par :

Solution de Giemsa.	10 gouttes
Eau distillée.	10 cc.

Placer la coupe inclinée, la face tournée en bas pour éviter les dépôts. Renouveler le bain après la première demi-heure. Laver rapidement à l'eau distillée, puis passer

successivement quelques minutes dans chacun des bains suivants :

a) Acétone.	95 cc.
Xylol.	5 cc.
b) Acétone.	70 cc.
Xylol.	30 cc.
c) Acétone	30 cc.
Xylol.	70 cc.
d) Xylol pur.	

Monter à l'huile de cèdre ou au baume.

f) *Colorations des coupes de tissus par l'hématéine-éosine.*

On doit avoir à sa disposition une batterie de tubes Borrel contenant :

1° Hématéine alunée de Mayer ;

2° Solution aqueuse à 1 p. 100 d'éosine, ou bien le mélange de Mann pour l'étude des protozoaires ou pour la recherche des corps de Negri dans la rage :

Bleu méthylène à 1 p. 100, sol. aq. . . .	35 cc
Eosine à 1 p. 100, solution aqueuse. .	45 cc.
Eau distillée.	100 cc.

4° Alcool à 70° ;

5° Alcool à 90° ;

6° Alcool absolu ;

7° Xylol pur.

Les coupes fixées, déparaffinées, déshydratées, puis repassées à l'eau, sont d'abord plongées 5 à 20 minutes dans l'hématéine.

Laver abondamment dans l'eau. Examiner à un faible grossissement pour voir si la coloration est suffisante. Si elle est trop intense, différencier par l'alcool chlorhydrique, plus ou moins longtemps. Si elle est bonne, différencier seulement quelques secondes par l'alcool chlorhydrique et laver abondamment. On laisse les lames dans l'eau courante ou mieux dans l'eau additionnée de 1 p. 100 de carbonate de lithium pendant 10 à 20 minutes.

Colorer ensuite 1 minute dans l'éosine (ou bien de 10 minutes à 24 heures dans le Mann). Laver abondamment à l'eau.

Différencier par l'alcool à 70°, puis dans l'alcool à 90° jusqu'à disparition de la teinte rouge diffuse. Déshydrater rapidement par l'alcool absolu. Essuyer le dessous de la lame

pour enlever l'excès d'alcool et plonger dans le xylol pur pendant 15 à 20 secondes, puis monter dans le baume de Canada ou dans l'huile à immersion.

g) *Coloration au safran de Pierre Masson* (méthode excellente).

Pour préparer la solution de safran, on fait bouillir dans 100 centimètres cubes d'eau distillée 1 gramme de stigmates aussi frais que possible. Après une heure d'ébullition on filtre sur papier et on ajoute au liquide 1 centimètre cube de solution de tanin à 5 p. 100 et 1 centimètre cube de solution commerciale de formol [1].

Les coupes, fixées et hydratées par immersion dans l'eau après déparaffinage, sont colorées à l'hématéine alunée de Mayer comme ci-dessus, différenciées à l'alcool chlorhydrique, bleuies dans la solution de carbonate de lithium à 1 p. 100, lavées et colorées 1 heure dans la solution d'éosine à 1 p. 100, lavées et immergées pendant 10 minutes dans la solution de safran, puis finalement lavées, déshydratées et montées.

Les noyaux apparaissent en bleu foncé, les protoplasmas en rose saumon, les granulations éosinophiles en rouge vif, les fibres nerveuses, élastiques et musculaires en rose vif, les fibres conjonctives, l'osséine et la chondrine en jaune d'or.

h) *Méthode au bleu polychrome de Unna* (frottis et coupes).

Colorer dans le bleu polychrome pur (5 minutes à 12 heures à froid). Laver rapidement à l'eau. Différencier à l'éther glycérique de Unna étendu de 3 à 5 parties d'eau. Laver abondamment plusieurs minutes. Déshydrater à l'alcool absolu, rapidement. Passer au xylol et éclaircir à l'huile de cèdre avant montage.

C. — COLORATION DES SPORES

Méthode de Möller. Fixer 2 minutes par l'alcool absolu, puis 2 minutes par le chloroforme. Sans laver, faire agir sur

1. On peut éviter cette manipulation en employant la matière extraite préalablement du safran (polychivite RAL) que l'on met en solution à raison de 0 gr. 2 dans 100 centimètres cubes d'eau et 1 centimètre cube de formol. La polychivite, très hygroscopique, est livrée en tubes scellés de 0 gr. 2.

la préparation : acide chromique à 5 p. 100, 3 à 5 minutes.

Colorer à chaud par la solution de fuchsine de Ziehl, 5 minutes (ou à froid 5 heures). Décolorer par l'acide sulfurique à 5 p. 100, 5 secondes, ou par le chlorhydrate d'aniline (solution aqueuse à 2 p. 100) 1 minute, puis par l'alcool absolu.

Laver à l'eau. Recolorer avec la solution aqueuse à 1 p. 100 de bleu de méthylène 1/2 minute, ou par le bleu de Kühne dilué à 1 p. 3. Laver à l'eau. Egoutter, sécher.

D. — *COLORATION DES CILS*

a) *Méthode de Löffler-Nicolle-Morax.* — Pour la coloration des cils il importe de ne faire usage que de lamelles ou lames bien propres, qu'on lave à l'alcool, puis à l'éther, et sur lesquelles on laisse tomber avec une anse de platine une goutte de culture jeune, diluée dans l'eau stérile. Après dessiccation à l'étuve, sans passer sur la flamme, on verse sur la préparation une grosse goutte du mordant ci-après, en chauffant jusqu'à émission de vapeurs ; on lave aussitôt à l'eau distillée et on recommence de même 3 ou 4 fois.

Mordant (encre de fuchsine) :

Tanin (à l'éther) sol. aq. à 25 p. 100. .	10 cc.
Sol. sat. à froid de sulfate ferreux. . .	5 cc.
Sol. alcool. saturée de fuchsine.	1 cc.

Colorer ensuite par la fuchsine de Ziehl à chaud jusqu'à émission de vapeurs, pendant 10 à 15 secondes. Laver aussitôt à l'eau distillée, sécher, monter.

b) *Méthode de van Ermengem* (très élégante, recommandée).

1° *Fixateur* : Faire agir pendant une demi-heure à froid ou 5 à 10 minutes à chaud, sur platine chauffante :

Acide osmique à 2 %.	1 cc.
Tanin à 20 %.	2 cc.
Acide acétique.	IV gtt.

Laver soigneusement à l'eau distillée.

2° *Sensibilisateur* : solution aqueuse de nitrate d'argent de 0,5 à 2 p. 100. Faire agir pendant 2 à 3 minutes jusqu'à ce

que les gouttes prennent une teinte grisâtre. Ne pas laver. Plonger 1 à 2 minutes dans :

3º *Réducteur* :

Acide gallique.	5 gr.
Tanin	3 gr.
Acétate de soude fondu.	10 gr.
Eau distillée	350 gr.

Après lavage, sécher rapidement ; examiner. Si la coloration n'est pas suffisante, on recommence, après lavage, la sensibilisation et la réduction. Renouveler la solution argentique dès qu'elle commence à noircir.

c) *Méthode de Pitfield, modifiée par Benignetti et Gino.*

Solution colorante : A 3 centimètres cubes de solution alcoolique saturée de violet de gentiane, on ajoute 5 centimètres cubes d'une solution aqueuse saturée d'alun et 5 centimètres cubes de la solution suivante :

Sulfate de zinc.	1 gr.
Tanin	10 gr.
Eau	100 cc.

On dépose quelques gouttes de la solution colorante ainsi préparée sur la lamelle, sur laquelle on a préalablement fixé par la chaleur une gouttelette de l'émulsion des microbes dont on veut colorer les cils. On chauffe directement à la veilleuse d'un bec Bunsen jusqu'à émission de vapeurs ; on lave soigneusement à l'eau et on sèche à l'air, puis on monte dans le baume.

Cette méthode, très simple, donne de bons résultats.

d) *Méthode d'Edgar Lancereaux.*

1º *Mordant* :

Chlorure d'antimoine.	1 gr.
Tanin	5 gr.
Formol.	10 cc.
Eau distillée.	100 cc.

2º *Sensibilisateur* :

Nitrate d'argent.	1 gr.
Eau distillée.	20 cc.

3º *Réducteur* :

Métol (paraméthylaminophénol). . . .	1 gr.
Eau distillée.	20 cc.

(On peut le stabiliser avec le sulfite de soude en ajoutant 5 grammes de ce produit.)

Utiliser des lames propres, lavées à l'alcool. Mettre des gouttes séparées d'une dilution de culture de 24 heures dans de l'eau ordinaire (l'eau physiologique précipiterait les sels d'argent et rendrait la préparation opaque). Faire sécher à l'étuve.

1° Mettre le mordant sur la préparation à colorer ; chauffer fortement au Bunsen vers 60° ; laisser refroidir 10 minutes. Laver à l'eau courante, puis à l'eau distillée.

2° Faire agir le nitrate d'argent ammoniacal. On peut obtenir un noircissement de la préparation immédiatement. On chauffe légèrement sur la flamme du Bunsen jusqu'à ce qu'on obtienne une teinte métallique, laver largement à l'eau ordinaire ou à l'eau distillée.

3° Faire agir le réducteur au métol pendant une minute.

Laver à l'eau ordinaire, sécher et examiner à l'immersion.

E. — *COLORATION DES CAPSULES*

a) *Méthode de Johne* : Colorer 1 ou 2 minutes avec une solution aqueuse à 2 p. 100 de violet de méthyle ou de violet de gentiane tiède.

Laver à l'eau 2 secondes. Traiter par solution à 1 p. 100 ou à 2 p. 100 d'acide acétique, 10 secondes. Laver à l'eau. Examiner dans l'eau (méthode excellente pour l'étude des capsules de la bactéridie charbonneuse).

b) *Méthode de Klett* : Colorer à chaud, jusqu'à ébullition, par solution hydro-alcoolique de bleu de méthylène (1 gramme de bleu, 10 grammes d'alcool, 100 grammes d'eau). Laver à l'eau. Traiter par une solution de fuchsine de même concentration que celle de bleu de méthylène, 5 secondes. Laver à l'eau, examiner dans l'eau.

c) *Méthode de Friedlander* : Laver d'abord la préparation pendant 2 minutes (après fixation) dans une solution à 1 p. 100 d'acide acétique. Egoutter. Sécher.

Colorer quelques secondes par une solution de violet de gentiane dans l'eau saturée d'aniline. Laver à l'eau, sécher.

Pour les coupes, colorer pendant 24 heures à 37° dans :

Solution concentrée alcoolique de violet de gentiane	50 cc.
Acide acétique	10 gr.
Eau distillée	100 cc.

Différencier par solution d'acide acétique à 1 p. 100. Laver à l'eau, égoutter, etc.

F. — *EXAMEN DES CAPSULES ET DES CILS SANS COLORATION*

Méthode de Gins à l'encre de Burri (très simple et recommandée).

On dépose, au centre d'une lame, une gouttelette d'encre de Burri et on mélange ensuite à celle-ci, avec un fil de platine, une trace de la culture à étudier, délayée dans une gouttelette d'eau de volume égal à celui de la gouttelette d'encre. On étale le mélange avec le bord d'une lamelle couvre-objet, on laisse sécher un instant et on examine dans une goutte d'huile à immersion. Les bacilles, les capsules, les cils apparaissent nettement incolores sur le fond noir. Bien avant Burri, et dès 1884, Léo Errera (de Bruxelles) avait proposé l'emploi de l'encre de Chine pour l'étude des infusoires.

G. — *COLORATIONS DES VIRUS FILTRANTS*
(Péripneumonie, Chlamydozoaires, Strongyloplasmas, etc.)

Il est également indispensable de diluer les virus ou les émulsions de tissus (molluscum contagiosum, lymphe vaccinale ou variolique, etc.), avec de l'eau distillée ou de l'eau salée physiologique stérile. Fixer par alcool absolu, ou par mélange en parties égales d'alcool méthylique et d'éther, ou par l'alcool au sublimé (*Schaudinn*) : 2 parties de solution aqueuse saturée de sublimé ou mieux d'après la méthode de Borrel par le mélange suivant :

Acide osmique	2 gr.
Acide chromique	3 gr.
Chlorure de platine	2 gr.
Acide acétique glacial	20 gr.
Eau distillée	350 cc.

Colorer (*Borrel*) par solution aqueuse de rouge Magenta à la température de 50° pendant 10 à 15 minutes ; traiter pendant 5 minutes par une solution de picro-indigo-carmin (indigo-carmin ou sulfo-indigotate de soude, 0 gr. 75, dissous dans 100 centimètres cubes d'eau distillée ; filtrer ; ajouter eau distillée saturée d'acide picrique 100 centimètres cubes). Laver rapidement à l'eau, passer à l'alcool à 95°, éclaircir au xylol et monter au baume, ou examiner dans une goutte d'huile à immersion.

On peut aussi employer la méthode de Halberstädter et V. Prowazek qui est une modification de celle de Giemsa. Le réactif colorant est alors composé comme suit :

Solution d'éosine (2 cc. 5 de solution d'éosine à 1 p. 100 dans 500 cc d'eau). . .	12 p.
Azur I, sol à 1 p. 1.000 aqueuse . . .	3 p.
Azur II, sol. à 0,8 p. 1.000 aqueuse . . .	3 p.

ou bien encore (*Lindner*) :

Eau distillée	10 cc.
Colorant de Giemsa glycériné.	V gtt.
Acide acétique pur.	1 gtt.

H. *COLORATIONS VITALES*

Certaines couleurs basiques d'aniline sont absorbables par les cellules vivantes lorsqu'elles sont solubles dans les lipoïdes qui entrent dans la constitution du protoplasma.

Les plus intéressantes à ce point de vue sont : le *bleu de méthylène* et le *rouge neutre*.

Bleu de méthylène. Il faut employer le *bleu médicinal* pur français RAL, en solution à 0,5 p. 100 ou 1 p. 100 dans l'eau salée physiologique.

Rouge neutre. Prend une couleur rouge écarlate en milieu acide, jaune ou rouge orange en milieu alcalin. On l'emploie en solution très diluée (1/2 à 1 centimètre cube de solution aqueuse saturée, dans 100 centimètres cubes d'eau salée physiologique).

Beaucoup de petits animaux aquatiques, et même des poissons, vivent très bien dans des solutions de rouge neutre à 1 p. 10.000 ou à 1 p. 100.000. Leurs tissus se colorent en rouge. Le protoplasma et le noyau des cellules restent inco-

lores. Le pigment est fixé par les granulations protoplasmiques.

a) *Colorations des microbes vivants* (pour étudier leur structure).

Méthode de Neisser : Colorer quelques secondes avec un mélange de 2 parties de la solution *a* et 1 partie de la solution *b* ci-après :

Solution a :

Bleu médicinal en poudre.	1 gr.
Alcool à 96°.	20 cc.
Eau distillée.	1.000 cc.
Acide acétique cristallisable.	50 cc.

Solution b :

Alcool à 96°.	10 cc.
Eau distillée.	300 cc.

Laver à l'eau. Recolorer pendant 3 secondes avec une solution de chrysoïdine (colorant azoïque, chlorhydrate de diaminoazobenzène) : 2 grammes de chrysoïdine dissoute dans 300 centimètres cubes d'eau bouillante filtrée et refroidie. Laver encore à l'eau, sécher à l'étuve à 37° et examiner. Ou bien employer le bleu azur de Giemsa (1 goutte de solution glycérinée de bleu de Giemsa pour 1 centimètre cube d'eau distillée). Laisser agir 10 à 30 minutes la préparation tournée face en dessous, à la surface du bain colorant pour éviter les dépôts, laver à l'eau, sécher et examiner.

I. COLORATION POST-VITALE

Méthode de J. Sabrazès au bleu de toluidine phéniqué pour la cytologie et la bactérioscopie des crachats, du lait centrifugé, des dépôts d'urines, des résidus gastriques, des mucosités fécales, des exsudats fibrineux et purulents.

Le titre de la solution colorante peut varier de 1 p. 500 à 1 p. 100. La formule est la suivante :

Bleu de toluidine.	0 gr. 50
Alcool à 95°.	10 à 15 cc.
Acide phénique.	3 gr.
Eau distillée stérilisée q. s. pour. . . .	100 cc.

Le réactif est stable ; il se conserve indéfiniment aseptique. Le flacon à poste fixe se sédimente constamment. On

y puise par capillarité avec une effilure de pipette plongée dans le liquide sans toucher le fond. Sur le frottis récent, étalé en couche mince, sans aspérités, bien séché, on renverse la lamelle chargée de la gouttelette de bleu ; elle doit s'appliquer hermétiquement sur la lame. La solution colorante imprègne très vite les éléments desséchés du frottis.

Le bleu de toluidine colore en bleu plus ou moins pâle les cytoplasmes, en violet rougeâtre les noyaux, en violet les nucléoles, en rouge le mucus, en rouge violâtre l'amyloïde, en bleu pur la substance colloïde, en bleu terne certaines substances lipoïdes, la fibrine en bleu, les fibres élastiques en vert pâle, les grains d'amidon en bleu pâle verdâtre.

J. — *COLORATION DES CHAMPIGNONS*

(Hyphomycètes, Teignes, etc., voir chapitre XXXIX).

Dégraisser d'abord soigneusement par l'alcool-éther. Colorer pendant 5 à 10 minutes dans une solution de bleu alcalin de Löffler ou de thionine phéniquée.

Laver à l'eau. Passer rapidement à l'alcool absolu, sécher et examiner dans une goutte d'huile de cèdre.

K. — *MONTAGE DES PRÉPARATIONS MICROSCOPIQUES POUR L'EXAMEN APRÈS COLORATION*

Les préparations colorées s'abîment assez rapidement et se décolorent. Il importe de pouvoir les recolorer si c'est nécessaire. Il ne faut donc pas, surtout lorsqu'il s'agit de préparations de sang contenant des parasites, les monter dans le baume de Canada comme on le fait habituellement pour les coupes histologiques. Il est beaucoup préférable de se servir de l'huile à immersion, ou mieux encore de paraffine liquide bien transparente (huile de paraffine).

Nota. — Pour les transports lointains et la conservation indéfinie, on protégera très simplement les préparations sèches et fixées de sang ou de frottis, colorées ou non colorées, en les recouvrant d'une mince couche de paraffine fusible à 45°, dissoute dans du xylol (parties égales de

paraffine et de xylol) qu'on laisse évaporer à l'air libre à l'abri des poussières. Lorsqu'on veut étudier et recolorer ces préparations, rien n'est plus facile que de dissoudre dans du xylol pur la mince couche de paraffine qui les recouvrait.

CHAPITRE VIII

TECHNIQUE DE FIXATION ET DE COLORATION DU SANG ET DES PROTOZOAIRES SANGUICOLES

A. Méthodes de fixation des frottis de sang.

1° Par l'alcool absolu (la plus pratique, mais l'alcool doit être rigoureusement *absolu*) ; le conserver en petits flacons bouchés à l'émeri et contenant, dans un sachet de toile, quelques cristaux de sulfate de cuivre déshydraté (par calcination).

Temps : une demi-heure d'immersion (20 minutes au moins).

2° Par l'alcool-éther (parties égales) : 10 minutes. Bon pour l'emploi du *Giemsa,* mais inférieur au précédent.

3° Par l'alcool méthylique seul, 5 minutes (procédé recommandé).

4° Par l'alcool méthylique-acétone (parties égales) : 2 à 5 minutes.

5° Par le chloroforme : quelques secondes suffisent.

6° Par l'acide chromique (*Malassez*), solution à 1 p. 100 : 5 à 10 minutes, laver ensuite à l'eau distillée. Très bon fixateur.

7° Sublimé iodé (*Dominici et Lenoble*). On prépare le bain suivant :

Teinture d'iode fraîche.	10 cc.
Solution aqueuse saturée de sublimé. . .	90 cc.

Il se forme un précipité. On filtre, et c'est dans le filtrat jaune clair qu'on plonge les lames pendant 25 secondes.

Laver à l'eau courante. Le mélange ne se garde pas au delà de quelques heures.

8° Par les vapeurs osmiques : 10 secondes.

9° Par le formol. Vapeurs ou immersion dans solution alcoolique de formol à 1 p. 100. Durée d'action : 1 minute.

10° Par le Flemming (*Jolly*). Le liquide de Flemming se compose de :

Acide chromique à 1 p. 100.	15 vol.
Acide osmique à 2 p. 100.	4 vol.
Acide acétique cristallisable.	1 vol.

10 minutes en plongée. Laver ensuite à l'eau courante. Très bon fixateur pour la coloration de la chromatine des noyaux.

11° Par la chaleur (pour la coloration au triacide d'Ehrlich).

B. **Coloration du sang.**

a) *Méthode au triacide d'Ehrlich.*

Le triacide d'Ehrlich est composé de deux colorants acides et d'un neutre (vert de méthyle). On peut se le procurer tout préparé chez Cogit, à Paris, ou le préparer soi-même comme il a été dit au chapitre VII, E.

Durée d'action : 30 minutes sur lames fixées par la chaleur.

Résultats : hématies couleur brique.

Noyaux bleu pâle, peu visibles.

Granulations neutrophiles très nettes sous forme de pointillés violets.

Granulations éosinophiles oranges.

Hématoblastes gris violet, à peine visibles.

b) *Méthode de Dominici : Bleu de toluidine, éosine, orange.*

Traiter d'abord par une solution en parties égales à 1 p. 100 d'éosine et d'orange pendant 2 à 5 minutes. Laver.

Faire agir une solution aqueuse à 1 p. 200 de bleu de toluidine pendant 2 à 5 minutes.

Sans laver, passer dans l'alcool à 60° rapidement, puis dans l'alcool à 90°, puis dans l'alcool absolu. Sécher et examiner.

Cette coloration met en évidence : noyaux, protoplasma et granulations.

Hématies apparaissent roses ou oranges.

Noyaux bleus.

Granulations éosinophiles roses ou orangées.

Granulations neutrophiles violet rose.
Hématoblastes bleu pâle.

c) *Méthode de Romanowsky.*

Fixation à la chaleur à 105-110°. Coloration 1 ou 2 heures dans :

Sol. aqueuse saturée de bleu de méthylène.	2 parties
Solution aqueuse d'éosine à 1 p. 100. . .	5 parties

Ne se conserve pas. Laver à l'eau courante, sécher.

d) *Méthode de Laveran au bleu Borrel.*

On prépare séparément :

Une solution aqueuse d'éosine à 1 p. 1.000.
Une solution aqueuse de tanin à 5 p. 100

Pour colorer, *on mélange au moment de s'en servir*, en filtrant les deux premières sur un petit entonnoir :

Solution aqueuse d'éosine à 1 p. 1.000. .	4 cc.
Bleu Borrel	1 cc.
Eau distillée.	6 cc

On place la lame dans le bain en position verticale pour éliminer le précipité qui se forme. Colorer 20 minutes ; laver à grande eau. Faire agir la solution de tanin 1 minute. Laver à l'eau distillée, sécher.

Laveran emploie aussi l'azur II de Grübler au lieu du Bleu Borrel. Solution aqueuse saturée d'azur II, 1 centimètre cube (filtrer au moment de s'en servir), verser dans :

Solution aqueuse d'éosine à 1 p. 1.000 (filtrée)	2 cc.
Eau distillée.	8 cc.

Colorer 10 minutes, laver, passer au tanin, laver, sécher.

e) *Méthode de Giemsa.*

Fixer par l'*alcool absolu* 30 minutes.

Au sortir de l'alcool, les lames étant encore un peu humides, les plonger dans le bain colorant, inclinées, de telle sorte que les précipités ne se déposent pas sur la préparation :

Solution de Giemsa (1).	1 partie
Eau ordinaire (préalablement additionnée de 2 gouttes d'un mélange à parties égales d'alcool méthylique et de glycérine pure par cent. cube.	9 parties

1. La solution de Giemsa, marque RAL concentrée et glycérinée, se conserve pendant très longtemps. On peut se la procurer toute préparée à Paris, chez Poulenc.

Colorer 20 à 30 minutes, laver à grande eau et sécher. Eclaircir s'il y a lieu par lavage rapide de quelques secondes à une minute dans une solution à 1 p. 100 d'acide borique suivie de lavage à l'eau.

La dilution du Giemsa doit être faite au moment de l'usage, car elle perd très vite sa puissance colorante. Pour l'étude des filaires il faut employer une dilution faible, à 1 p. 40.

f) *Méthode de R. Ross et Ruge.* (Pour la recherche des hématozoaires et des embryons de filaires.)

Au lieu d'étaler le sang en couche mince, on en dépose une grosse goutte au milieu d'une lame et on laisse sécher à l'étuve pendant environ deux heures, à l'abri des mouches. Lorsqu'elle est sèche, on la traite pendant 5 à 10′ par un mélange de :

Formol.	2 cc.
Acide acétique	1 cc.
Eau.	100 cc.

Ce mélange fixe le sang et dissout en même temps l'hémoglobine.

On lave à l'eau.

On colore ensuite par le Giemsa (1/2 heure à 1 heure) ou par la méthode de Laveran à l'éosine-bleu Borrel, ou encore par l'hématoxyline (filaires).

Lorsque les hématozoaires sont rares dans le sang, cette technique permet de les découvrir avec plus de facilité.

g) *Coloration vitale du sang. Méthode de Pappenheim.*

Sur un porte-objet on dépose, avec l'extrémité d'une pipette, une gouttelette de solution alcoolique à 1 p. 100 de l'un des colorants ci-après :

Brillant Crésylbleu (Grübler) ou Azur II,
ou Soudan.

On laisse sécher, puis, immédiatement à côté, on dépose une gouttelette de sang frais qu'on recouvre d'une lamelle. Le sang s'étale sous celle-ci jusqu'à atteindre le dépôt sec de matière colorante, qu'il dissout de proche en proche. On peut aussi se servir d'une solution de violet de méthyle dans l'eau salée physiologique à 8,5 p. 1.000 et dont on mélange une gouttelette à une goutte de sang frais, directement sur lame.

C. Coloration des protozoaires et parasites inclus dans des cellules.

a) *Fixation au Bouin* :

Solution aqueuse saturée d'acide picrique.	75 cc.
Formol.	20 cc.
Acide acétique glacial.	5 cc.

Pour les frottis, amibes, etc., 30 minutes d'immersion ; laver à l'eau 5 minutes.

b) *Coloration.*

Mordançage des frottis (amibes, protozoaires) pendant 15 minutes dans une solution d'alun de fer ammoniacal à 3 p. 100.

Poser la lamelle sur lame recouverte de la solution et maintenir celle-ci sur platine chauffante à 40° au plus pendant 15 minutes.

Passer à l'eau. Colorer pendant 15 minutes en chauffant encore à 40° avec la solution d'hématoxyline à 5 p. 100. Les préparations deviennent noires. Décolorer très progressivement à froid, sous le microscope, avec une solution d'alun de fer à 1 p. 100. Laver à l'eau. Monter. A aucun moment ne laisser la préparation se dessécher.

c) *Coloration des coupes d'intestin pour la recherche des amibes ou infusoires.*

Colorer les coupes par la technique ci-dessus à l'hématoxyline au fer. Après décoloration et lavage à l'eau, colorer 1/4 d'heure dans solution éosine-vert-lumière. La préparation est rouge. Différencier à l'alcool absolu acétique à 10 p. 100 jusqu'à l'apparition des teintes vertes du tissu conjonctif et du mucus. Les muscles et les épithéliums demeurent roses. Substituer directement le xylol à l'alcool absolu acétique et monter au baume.

D. Coloration des coupes de tumeurs cancéreuses.

a) *Méthode de Borrel* (modifiée par *Coca*) sur coupes de 5 microns d'épaisseur, provenant de fragments fixés au Zenker, voir chap. IX et enrobés en paraffine.

Immersion pendant 10 minutes dans une solution alcoolique d'iode à 1 p. 100.

Lavage rapide avec alcool à 90° pour enlever l'excès d'iode.

Lavage à l'eau.

Immersion pendant une heure dans une solution aqueuse saturée de Magenta.

Lavage à l'eau.

Immersion pendant 5 minutes dans la solution suivante :

Indigo carmin (ou sulfo-indigotate de soude).	0 gr. 75
Eau distillée.	100 cc.

Filtrer et ajouter :

Eau distillée saturée d'acide picrique . .	100 cc.

Différencier par lavage à l'alcool à 95° (avec le flacon compte-gouttes) sans lavage préalable à l'eau.

b) *Méthode à l'éosine-bleu.*

Immersion pendant 10 minutes dans la solution alcoolique d'iode à 1 p. 100.

Lavage rapide à l'alcool à 95° pour éliminer l'iode.

Lavage à l'eau.

Immersion pendant 45 minutes à la température de 55° dans une solution aqueuse d'éosine à 5 p. 100.

Lavage à l'eau.

Immersion pendant 20 minutes dans la solution suivante, diluée à raison de 5 p. 100 dans l'eau distillée :

Carbonate de potasse.	1 gr.
Bleu de méthylène médicinal.	1 gr.
Eau.	100 cc.

Différencier par l'alcool à 95°.

E. **Fixation et coloration des frottis de tumeurs** : **Épithélioses, Clavelée, Vaccine, etc.** (*d'après Borrel*).

Etaler le frottis en couche mince sur lame et, avant toute dessiccation, passer rapidement celle-ci dans une solution de tanin à 5 p. 100 qui produit instantanément l'adhérence de la pellicule.

On verse ensuite le fixateur sur la lame (fixateur acéto-osmochromique de préférence) (voir chap. IX, A, e.)

Il se produit un léger précipité de tannate d'osmium que l'on entraîne par un excès de fixateur.

Fixer environ 1 heure.

Laver à l'eau.

Colorer par la méthode Rouge Magenta-picro-indigo-carmin, indiquée ci-dessus en D.

CHAPITRE IX

FIXATION ET INCLUSION DES FRAGMENTS DE TISSUS OU D'ORGANES DESTINÉS A FOURNIR DES COUPES.

Les fragments coupés au rasoir, — jamais aux ciseaux, — doivent être très petits : 1 à 2 millimètres d'épaisseur sur 5 à 6 millimètres carrés de surface.

Le temps de fixation varie de 1 à 24 heures, suivant la nature des tissus et le liquide fixateur employé.

Après le bain fixateur, laver soigneusement la pièce à l'eau courante pendant 1 à 4 heures. Si la fixation a été faite avec un liquide au sublimé, laver la pièce directement dans :

Alcool à 70°	100 cc.
Teinture d'iode	3 cc.

L'y laisser quelques secondes, puis laver.

Immerger ensuite dans l'alcool à 70° où on conserve jusqu'au moment de l'inclusion.

Il est toujours utile de faire usage, pour divers fragments l'un même organe ou tissu, de fixateurs différents.

Si l'on n'a pas de solutions fixatrices toutes préparées sous la main, fixer les fragments d'organes par simple immersion dans une solution à 10 p. 100 de formol dans l'eau distillée. Ce procédé est pratiquement suffisant pour la recherche des microbes dans les tissus lorsqu'on ne se propose pas d'étudier minutieusement les rapports de ces microbes avec les cellules.

Lorsqu'il est indiqué de respecter autant que possible l'intégrité des cellules, il est recommandable d'employer le procédé de fixation graduée de *Rubenthaler* qui consiste à immerger la pièce successivement dans le bain fixateur dilué d'abord avec 3/4 d'eau, puis avec 1/2, 1/4 et enfin dans le fixateur pur, pendant une demi-heure dans chaque dilution, et en opérant sur de très petits fragments de pièce.

Pour fixer et inclure dans la paraffine les fragments d'organes ou les petits animaux destinés aux coupes microscopiques, il est très commode, comme l'ont indiqué *M. Caullery* et *A. Chapelier*, de se servir de tubes de verre dont l'extrémité inférieure a une section carrée, de 6 millimètres de côté environ, qu'on ferme par un fond de toile maintenue par une ligature. On y introduit les objets à couper. Il suffit alors de porter le tube et son contenu de liquide jusque et y compris la paraffine fondue.

A chaque changement, le liquide filtre à travers la toile. On peut naturellement effectuer des lavages aussi soignés que l'on veut. La paraffine de la dernière opération, maintenue dans le tube et refroidie rapidement, fournit, grâce à la forme du tube, un bloc immédiatement utilisable sur le microtome, sans rognures. On le démonte en chauffant légèrement le bas du tube et en poussant.

Ce procédé très simple évite toute perte de matériel.

A. **Liquides fixateurs pour les fragments d'organes.**

a) *Liquide de Carnoy* :

Bichlorure de mercure à saturation dans l'eau distillée chaude, puis refroidie et décantée.	100 cc.
Acide acétique cristallisable.	5 cc.

b) *Liquide de Zenker* [1] :

Bichlorure de mercure (aq. à saturation).	5 cc.
Bichromate de potasse	2 gr. 50
Sulfate de soude.	1 gr.
Eau distillée.	100 cc.

c) *Liquides de Flemming* (conserver à l'obscurité en flacons noirs ; à n'employer que pour de très petits fragments de tissus de 2 à 3 millimètres d'épaisseur) :

1) Solution forte :

Acide chromique à 1 p. 100.	15 cc.
Acide osmique à 2 p. 100	4 cc.
Acide acétique cristallisable.	1 cc.

1. Il est parfois recommandé d'ajouter au Zenker, immédiatement avant l'usage, 5 centimètres cubes d'acide acétique (surtout pour la recherche des corps de Negri dans la corne d'Ammon).

2) Solution faible :

Acide chromique à 1 p. 100.	25 cc.
Acide osmique à 1 p. 100.	10 cc.
Acide acétique à 1 p. 100.	10 cc.
Eau distillée	55 cc.

d) *Liquide de Van Gehuchten* (surtout pour les fragments de tissu rénal) :

Alcool absolu.	60 cc.
Chloroforme.	30 cc.
Acide acétique cristallisable.	10 cc.

e) *Liquide de Borrel* (pour la fixation à basse température des organes glandulaires en très petits fragments ; température de 0 à 3° pour éviter l'autodigestion) :

Eau.	350 cc.
Acide chromique.	3 gr.
Bichlorure de platine.	2 gr.
Acide osmique	2 gr.
Acide acétique cristallisable.	20 gr.

(Immersion 10 à 15 minutes, puis lavage 15 minutes à l'eau courante avant de colorer.)

f) *Liquide de Dominici* :

Solution aqueuse saturée de sublimé. . .	90 cc.
Teinture d'iode du codex.	10 cc.

Les fragments doivent être immergés dans ce liquide pendant environ 2 heures, puis lavés quelques instants dans l'eau courante et ensuite plongés dans l'alcool à 70°, etc.

g) *Liquide de Perenyi* (pour la fixation des moustiques et des arthropodes en général) (6 à 24 heures d'immersion, puis alcool à 70°, alcool à 90°, alcool absolu, xylol et paraffine) :

Solution aqueuse d'acide chromique à 0,5 p. 100.	30 cc.
Solution d'acide azotique pur à 10 p. 100.	40 cc.
Alcool absolu.	30 cc.

h) *Liquide de Bouin* :

Solution aqueuse saturée d'acide picrique.	75 cc.
Formol (à 40 p. 100 du commerce) . . .	20 cc.
Acide acétique glacial.	5 cc.

A conserver en flacons bien bouchés, ou mieux à préparer au moment de s'en servir. On peut y laisser les objets

pendant plusieurs jours sans inconvénients (jusqu'à 8 jours). On les reporte ensuite dans de l'alcool à 90° qu'on change 2 ou 3 fois. C'est un excellent fixateur, très recommandable pour toutes les recherches bactériologiques et particulièrement pour celles qui portent sur les protozoaires.

i) *Fixateur de Bouin-Duboscq* (recommandé par *Chatton* pour les amibes) :

Alcool à 80°.	150 cc.
Formol commercial.	60 cc.
Acide acétique glacial.	15 cc.
Acide picrique cristallisé.	1 gr.

j) *Fixateur de Stamm* (recommandé pour les arthropodes) : Mélange bouillant, à parties égales de formol au quart et de sublimé saturé.

Nota. — Les fixateurs à base d'acide osmique, d'acide chromique, de bichromates, de chlorure d'or et le mélange de Flemming, gênent plus ou moins les colorations. Celles-ci ne sont pas défavorablement influencées par les alcools, l'éther, le sublimé, l'acide picrique, le formol et le liquide de Bouin.

B. **Inclusion des fragments d'organes destinés à la microtomie.**

a) *Déshydratation de la pièce.*

Porter dans alcool à 90° (6 à 12 heures), puis dans l'alcool absolu (6 à 24 heures suivant les dimensions des pièces).

On peut supprimer le bain d'alcool à 90° et faire passer directement la pièce du fixateur dans l'alcool absolu, mais dans ce cas, changer une ou deux fois le bain d'alcool absolu.

Imbibition par le xylol. Placer dans le xylol (6 à 12 heures).

Inclusion dans la paraffine. Plonger d'abord la pièce dans un mélange de xylol et de paraffine molle à parties égales, à l'étuve à 37° et l'y laisser 3 à 6 heures.

Puis, dans la paraffine fondue, à l'étuve à 50-55° ; ne pas dépasser 60°. Durée de séjour : 3 à 6 heures.

Enfin, porter dans un second bain de paraffine fondue pour éliminer toutes traces du dissolvant de la paraffine.

Couler dans les moules et immerger dans l'eau froide dès que la paraffine a fait prise.

Nota. — On prend en été de la paraffine fusible à 55°, en hiver de la paraffine molle (point de fusion 45-50°) [1].

On peut remplacer le xylol par le *toluène* ou mieux, pour les objets délicats, par l'*essence de bois de cèdre* qui éclaircit parfaitement, sans durcir.

c) *Collage des coupes sur lames par l'albumine de Mayer :*

Albumine d'œuf.	30 cc.
Eau distillée.	5 cc.
Glycérine à 30° B.	10 cc.

Bien mélanger et ajouter :

Menthol ou thymol, un cristal, ou 1 gramme de salicylate de sodium dissous dans un peu d'eau, puis filtrer sous verre à l'abri des poussières. (Cette filtration est très lente.)

C. Digestion artificielle des tissus et décalcification.

a) *Digestion artificielle des coupes de tissus cartilagineux, de la nucléine, de la gélatine et du tissu conjonctif réticulé :*

Trypsine.	0 gr. 20
Eau distillée.	100 cc.
Soude.	0 gr. 30
Chloroforme.	quelq. gouttes.

A l'étuve à 37° pendant 12 ou 24 heures ou au bain-marie.

Cette digestion peut se faire directement sur lames. On la suit au microscope et on l'arrête par lavage à l'eau acidulée, puis à l'eau courante.

b) *Décalcification des tissus osseux par la solution de Haug :*

Acide nitrique de densité 1,4.	10 gr.
Phloroglucine.	1 gr.

Faire dissoudre à chaud, ajouter ensuite :

Eau distillée.	100 cc.
Acide nitrique de densité 1,4.	10 gr.

Laver ensuite à l'eau courante pendant 48 heures.

1. Dans les pays chauds, on doit employer de préférence le mélange de paraffine de Dumège, fusible à 55°, qu'on se procure tout préparé chez Cogit.

CHAPITRE X

MARCHE A SUIVRE POUR LA DÉTERMINATION DES MICROBES D'APRÈS LEUR MORPHOLOGIE ET LEURS FONCTIONS BIOLOGIQUES.

I. — Examen microscopique.

a) *Sans coloration* en goutte pendante (sur cultures jeunes) : mobilité, forme et rapidité des mouvements.

b) *Avec coloration* (fuchsine, violet de gentiane, thionine, Giemsa) : forme des éléments, isolés ou groupés, dimension, arrangement en chaînes ou en amas, absence ou existence de spores.

c) *Méthode de Gram* : résistance ou décoloration au Gram-Lugol.

II. — Culture dans les milieux usuels.

a) *Bouillon simple et eau peptonée* : trouble ou limpidité après 24 heures ou plus à l'étuve à 37° et après 48 heures ou davantage à la température du laboratoire ; aspect du trouble, uniforme, grumeleux, ondes soyeuses, anneau muqueux adhérent au verre, etc., formation de voiles et aspect de ceux-ci (irisés, épais ou minces, muqueux ou secs, plissés ou lisses, etc.), formation d'un dépôt (pulvérulent, muqueux, caséeux, etc.), réaction alcaline ou acide après développement de la culture, odeur de la culture.

b) *Gélatine en plaques* à la température de 20-22°.
Date de l'apparition des colonies après ensemencement. Leur aspect, leur coloration, leur développement. Date et marche de la liquéfaction si elle se produit. Aspect et forme des colonies de surface et des colonies de profondeur. Odeur de la culture.

c) *Gélatine en piqûre.*

Aspect de la trace d'inoculation (invisible, granuleuse, arborescente, etc.). Marche de la liquéfaction (en forme d'entonnoir, de cupule, de bulle d'air, etc.).

d) *Gélose inclinée,* en surface.

e) *Sérum gélatiné incliné.*

f) *Pommes de terre.*

g) *Gélose glucosée et nitratée de Veillon* (culture anaérobie).

On déterminera, avec ces divers milieux, si le microbe est anaérobie ou aérobie, ou anaérobie facultatif. On précisera la température optimum de sa culture sur les milieux les plus favorables, sa résistance à la chaleur, et son aptitude à former des pigments colorés sur les divers milieux.

III. — Action sur les matières azotées.

a) *Eau peptonée simple* : formation d'indol.

b) *Albumine cuite* : tube de Mette pour la recherche des ferments protéolytiques.

c) *Lait* : coagulation par acidification ou par production de présure, peptonisation de la caséine :

Epreuve sur lait additionné de carbonate de chaux (pur et précipité) pour éviter la coagulation par les acides.

Epreuve sur lait coloré au bleu de tournesol avec 2 p. 1.000 de chlorure de calcium (température de 37°) pour préciser s'il s'agit d'une présure.

d) *Urée* : transformation en carbonate d'ammoniaque par sécrétion d'uréase.

e) *Nitrate* : eau peptonée à 1 p. 100 additionnée de 1 p. 100 de nitrate de potasse pur, stérilisée. 48 heures après ensemencement, rechercher la présence des nitrites par le réactif de Tromsdorf et noter sur les cultures :

Si le nitrate est décomposé avec dégagement gazeux ou sans formation de nitrites ;

Si le nitrate donne des nitrites sans dégagement gazeux ;

Si le nitrate n'est pas réduit.

On répétera les réactions sur les tubes témoins non ensemencés.

IV. — Action sur les hydrates de carbone.

A étudier sur un milieu uniformément constitué par :

Hydrate de carbone X.	3 gr. (aussi pur que possible).
Peptone	1 gr.
Eau distillée.	100 cc.

Ce milieu, réparti dans des tubes, est additionné pour chaque tube d'une pincée de carbonate de chaux précipité pur, puis stérilisé à l'autoclave, 20 minutes à 115°, sauf les solutions de lévulose qui doivent être stérilisées à froid par filtration.

Le milieu suivant peut aussi être utilisé pour l'étude de l'action des microbes sur les sucres :

Eau distillée.	1.800 cc.
Peptone.	10 gr.
PO^4HNa^2.	14,5 gr.
PO^4H^2K.	1,4 gr.
Agar.	2 gr.

Ce milieu a un pH qui varie entre 7,2 et 7,4, favorable au développement des principaux microbes pathogènes.

Les sucres sont ajoutés dans la proportion de 0,5 p. 100 environ.

Les hydrates de carbone choisis seront :

a) *Alcools polyatomiques* (que les microbes oxydants transforment en une aldose correspondante, par exemple : mannite en lévulose, sorbite en sorbose, etc... :

Glycérine.
Mannite.
Dulcite
Erythrite.

b) *Sucres en* C^5 :

Arabinose.
Xylose.

c) *Sucres en* C^6 :

Glucose.
Lévulose (cristallisée, solution stérilisée à froid).
Galactose.

d) *Sucres en* C^{12} :

Saccharose (rechercher s'il se produit une invertine).
Maltose.
Lactose.

e) *Autres hydrates de carbone* :

Dextrine, Inuline. Rechercher s'il se produit de la dextrinase et de l'inulase, par la liqueur de Fehling.
Amidon. Préciser si l'empois d'amidon est seulement liquéfié ou s'il est saccharifié. On prépare à cet effet un milieu spécial avec 5 p. 100 d'amidon et 1 p. 100 de peptone. On stérilise 45 minutes à 115° (la masse étant très peu conductible).

V. — Réduction des sulfates et formation d'hydrogène sulfuré.

Beaucoup de microbes réduisent les sulfates et produisent une plus ou moins grande quantité d'hydrogène sulfuré en se développant sur les milieux peptonés (liquides, gélatinés ou gélosés). Cette propriété est mise en évidence en ajoutant au milieu de culture solide (eau peptonée gélosée, par exemple) avant stérilisation, une quantité de carbonate de plomb telle que les particules insolubles de cette substance soient assez rapprochées pour donner à la masse une teinte blanchâtre homogène. Les colonies réductrices qui s'y développent prennent une teinte brune (sulfure de plomb) très caractéristique.

On peut aussi incorporer au milieu 1 gramme d'acétate de plomb par litre, toujours avant stérilisation. Le bouillon ne convient pas pour cet usage, car le plomb s'y précipite.

Il faut éviter de boucher les tubes ou vases de culture avec du caoutchouc lorsqu'on se propose de rechercher H^2S, car les bouchons et capuchons contiennent presque toujours du soufre.

S. T. Darling a proposé de remplacer l'acétate de plomb par le sous-nitrate de bismuth, dont 1 à 2 grammes p. 100, ajoutés aux milieux de culture, décèlent avec plus de sensibilité l'hydrogène sulfuré ou les composés sulfurés capables de former des sulfures métalliques. Tantôt c'est le milieu qui se colore après diffusion de l'hydrogène sulfuré, tantôt c'est le métal qui pénètre dans les corps microbiens, s'y

transforme en sulfure, et alors les microbes sont colorés en noir, soit en masse, soit par dépôt de granules placés à la périphérie ou aux extrémités des corps microbiens. Le bacille typhique, les paratyphiques, le bacille diphtérique, la bactéridie charbonneuse, ne donnent aucune réaction dans les milieux bismuthés.

VI. — **Action sur les animaux.**

Etude du pouvoir pathogène, de la propriété toxigène, de la virulence.

Tout microbe est *pathogène* quand il se montre capable d'engendrer des troubles morbides.

Tout microbe est *toxique* quand il sécrète ou contient un poison spécifique.

Tout microbe est *virulent* quand il se multiplie dans l'organisme attaqué et qu'il l'envahit plus ou moins vite et plus ou moins complètement.

VII. — **Recherche des caractères antigènes à l'aide d'un sérum spécifique.**

Agglutination, précipitation (extraits bactériens), fixation du complément ou de l'alexine (méthode de Bordet-Gengou).

VIII. — Détermination de quelques espèces microbiennes communes, par leurs principaux caractères biologiques [1].

I. — Microbes aérobies liquéfiant la gélatine.	Mobilité	Formation des spores	Aérobiose	Col. par le Gram.	Liq. de la gélat.	Coag. du lait	Fermentation du glucose	Réd. des sulfates	Indol	Pigments colorés	Observations
Bac. subtilis (Ehrenberg, Cohn)	+	+	+	+	+	pept.	—	±	—	—	Temp. 25 à 37°.
B. lactis albus (Löffler)	+	+	+	+	+	pept.				—	
B. ramosus liquefaciens (Flügge)	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	
B. brevis, lactis I (Flügge)	+	+	±	+	+	pept.	—			—	Très toxique.
B. panis viscosi II (Vogel)	+	+	±	+	+	+	—			—	Temp. 40 à 42°.
B. maïdis, (Pellagrae bac.) (Cuboni, Paltauf et Heider)	+	+	+	+	+	—	—	∓	—	—	Toxique souris.
B. alvei (maladie des abeilles) (Chesire et Cheyne)	+	+	±	+	+	+				—	Path. abeilles, mouches, souris.
B. megaterium (de Bary)	+	+	+	+	+	pept.	—	+	—	—	
B. mesentericus vulgatus (pomme de terre, Flügge)	+	+	+	+	+	pept	—	±	—	—	
B. pseudanthracis (Burri)	+	+	+	+	+	+	—			—	
B. lactis amari (lait amer, Flügge)	+	+	±	+	+					—	
B. mesenteroïdes (Deetjen)	+	+	+		+	+				—	
B. flavoviridis (Maschek)	+	+?	+		+					+	jaunâtre.
B. tenuis (Tyrothrix, Duclaux)	+	+	+	+	+	+	+			—	
B. distortus (Tyrothrix, Duclaux)	+	+	+	+	+	+	+			—	
B. turgidus (Tyrothrix, Duclaux)	+	+	+	+	+	pept.	—			—	
B. subfiliformis (Tyr. filiformis, Duclaux)	+	+	+		+	pept.				—	

1. On trouvera des indications plus complètes pour ces déterminations dans l'ouvrage de Teisi Matzuschita : *Bacteriologische Diagnostik* (S. Fischer, édit., Iéna, 1902) auquel sont empruntés les éléments de la liste ci-après d'espèces choisies parmi les 1.325 mentionnées par cet auteur.

B. virgula (Tyr. virgula, Duclaux)		+	+			—	+			—	
B. longus (Lactis VII, Flügge)	+	+	+	+	+	pept.				+	brun.
B. nigricans (Kern)	+	+	±		+					+	brun.
B. radians (lactis IX, Flügge)	+	+	+	+	+	pept.				+	brun chamois.
B. lactis niger (Gorini)	+	+	+	+	+					+	brun noir.
B. mesentericus fuscus (Flügge)	+	+	+	+	+					+	brun.
B. oogenes hydro-sulfureus (A. Zörkendörfer)	+	+	+	+	+			+		+	brun.
B. irideus (Tataroff)	+	+	+		+	—				+	jaune.
B. arachnoideus (lactis III, Flügge)	+	+	+	+	+	+	+			+	jaune.
B. termofluorescens (B. termo) (Dujardin-Vignal)	+	+	+	+	+					+	verdâtre.
B. coccineus (Pansini)	+	+	+	+	+					+	rouge.
B. mesentericus ruber (pomme de terre)	+	+	+	+	+		—	±	—	+	rouge.
B. filamentosus (pseudo-actinomycose) (Cozzolino)	+	+	±	+	+	+		—	—	+	rouge ; path. souris grise.
B. agilis	+	+	+	—	+					—	
B. albus liquefaciens (Klammann)	+	+	+	—	+					—	
B. viridis (diarrhée verte des enfants, Lesage)	+	+	+	—	+					+	vert fluorescent; path. lapins; temp. 35°.
B. violaceus (Zopf)	+	+	±	—	+		—		+		violet ; temp. 20°.
B. ruber (Zimermann)	+	+	+	—	+		+			+	rouge carmin.
B. proteus mirabilis (Hauser)	+	—	+	+	+		+			—	
B. albus putidus (Maschek)	+	—	+	+	+					—	Odeur putride.
B. Schützenbergii, Urobacillus (Miquel)	+	—	+	+	+					—	Ferm urée.
B. dysenteriae liquefaciens (Ogata)	+	—	+	+	+					—	Path. souris et cobayes
B. pyogenes liquefaciens (Levy)					+						Path. souris.
B. proteus septicus (Babès)	+	—	+	+	+					+	brun clair.
B. aqualitis luteus (Tataroff)	+	—	+		+	—				+	jaune.
B. subcoccus (Diplococcus luteus, Adametz)	+	—	+		+	+	—			+	jaune brun, rougeâtre.
B. cyaneophosphorescens (Photobact. cyaneum Ludwig)	+	—	±	+	+					+	vert phosphor.
B. sulfureus (Holschewnikoff)	+	—	+	+	+	pept	+	+		+	rouge.
Micrococcus agilis (Ali-Cohen)	+	—	+	+	+					+	rouge.
Sarcina mobilis (Mauréa)	+	—	+	+	+	—	—			+	rouge brique.

	Mobilité	Formation des spores	Aérobiose	Col. par le Gram.	Liq. de la gélat.	Coag. du lait	Fermentation du glucose	Réd. des sulfates	Indol	Pigments colorés	Observations
B. proteus vulgaris (Hauser)	+	—	+	—	+	+	+	+	+	—	
B. proteus sulfureus (Holschewnikoff)	+	—	+	—	+	pept.		+		—	
B. luminosus (Photobac. luminosum, Beyerinck)	+	—	∓	—	+					—	
B. phosphorescens indicus (Fischer)	+	—	+	—	+		—			—	
B. phosphorescens indigenus (Fischer)	+	—	+	—	+					—	
Vibrio granulatus (Kustcher)	+		+		+					—	non path.
Vib. radiatus (Kustcher)	+		+		+				—	—	Path. souris et cobayes
Vib. zonatus (Kustcher)	+		+		+				+	—	Path. souris et cobayes
Vib. coprophilus (Kustcher)	+		+		+				—	—	Path. cobayes.
Spirillum subtilissimum (Kustcher)	+		+		+					—	
Vib. choleræ (R. Koch)	+	—	+	—	+	+	—	+	+	—	Path.
Vib. Metschnikovii (Gamaleia)	+	—	+		+			+	+	—	Path. pigeons et cobayes.
Vib. Finkler et Prior	+	—	+		+	+	—	∓	∓	—	Path.
Vib. Kustcheri (Kustcher)	+		+		+				+	—	Non path.
Vib. Vogleri (selles diarrhéiques, Vogler)	+	—	+		+				—	—	Non path.
Vib. sputigenes (crachats) (Brix)	+	—	+	—	+	+			—	—	Odeur aromat.
B. cloacæ (Jordan)	+	—	±	—	+	+			+	—	
B. actinobacter polymorphus (Duclaux)	+		+		+	+	+	+		—	
Vib. choleroïdes (O. Bujwid)	+		+		+				—	—	Odeur mercaptan.
Vib. aquatilis (Günther)	+	—	+		+			+	—	—	
Vib. phosphoreus (Dunbar et Rumpel)	+	—	+		+				+	—	phosphor.
Vib. lissabon (Pestana et Bettencourt)	+	—	+		+				—	—	Path. cobaye.
Vib Massaouah (Pasquale)	+	—	+		+			+	+	—	Path.
Spirillum tyrogenum (fromage, Deneke)	+	—	+		+				—	—	Non path.

B. pyogenes fœtidus liquefaciens (Lanz)	+	—	±	—	+	—	+			+	brun et jaune, path.
Vib. liquefaciens (Bouhoff)	+		+		+	—			—	+	brun ; path. p. cobayes.
Spirillum undula (Ehrenberg)	+		+		+						
B. septicus (gangrène) (Babès)	+	—	+	—	+		+			+	brun jaunâtre ; path
B. meningitidis aerogenes (Centanni)	+	—	+	—	+		+			+	gris jaunâtre ; path. lapins.
B. citrinus (Maschek)	+		+		+					+	jaune citron.
B. citreus liquefaciens (Unna et Tommasoli)	+	—	+		+					+	jaune.
B. pseudo-tuberculosis liquefaciens (Cazal et Vaillard)	+	—	±	—	+					+	jaune.
B. chlorinus (Tataroff)	+	—	+		+	—				+	jaune vert.
B. aureus liquefaciens (Matzuschita)	+	—	+	—	+	+	—	—	+	+	jaune orange.
B. fluorescens liquefaciens (Flügge)	+	—	+	—	+	+	—	+		+	vert fluores.
B. pyocyaneus (Gessard)	+	—	+	—	+	+	—	+		+	vert fluores.
B. proteus fluorescens (H. Jäger)	+	—	+	—	+		+			+	vert fluores.
B. violaceus lutetiensis (Macé)			+		+					+	violet.
B. janthinus (Zopf)	+	—	+	—	+					+	violet.
B. cœruleus (Smith)		—	+		+					+	bleu.
B. ruber indicus (R. Koch)	+	—	+	—?	+					+	rouge brique.
B. ruber aquatilis (Lustig)	+	—	±		+				+	+	rouge framboise.
B. prodigiosus (Ehrenberg-Cohn)	+	—	+	—	+	+	+	±	±	+	rouge ; odeur de triméthylamine.
B. liquefaciens communis (Sternberg)	+	—	±	—	+					+	rouge
B. ruber sardinæ (Du Bois St-Sevrin)	+	—	+	—	+					+	rouge brun.
B. mycoïdes (Flügge : sol.)	—	+	+	+	+		—	—	—	—	
B. brassicæ (Pommer)	—	+	+		+					—	
B. casei (nº 16, Adametz)	—	+	+	+	+	pept				—	
B. gracilis (Zimmermann)	—	+	±	+	+					—	
C. filamentosus (E. Klein)	—	+	+		+					—	
B oxalaticus (Zopf)	+	+	+	+	+			—	—	—	
B. anthracoïdes (Hueppe et Wood)	—	+	+	+	+	+	—			—	Path. local. souris, cobayes, lapins.
B. anthracis (Bactéridie charbonneuse, Davaine et F. Cohn)	—	+	+	+	+	+	—	+	—	—	Path.

	Mobilité	Formation des spores	Aérobiose	Col. par le Gram.	Liq. de la gélat.	Coag. du lait	Fermentation du glucose	Réd. des sulfates	Indol	Pigments colorés	Observations
B. liquefaciens pyogenes (Matzuschita). . . .	—	+	+	+	+	+	—	—	+	—	Path. souris.
B pseudaceti (nº 15. Adametz)	—	+	+	+	+	pept.				—	Odeur butyr.
B. scaber (Tyrothrix scaber) (Duclaux). . . .		+	+	+	+	pept				—	
B. panis viscosi (Vogel).	—	+	+	+	+	+	—			—	
B. tricomii (gangrène sénile?, Eisenberg). . .	—	+	+	+	+					—	Path. cobayes, lapins, souris grises.
Sarcina alba (Maschek).	—	+¿	+	+	+					—	
B. Adametzi (nº 14. Adametz).	—	+	+	+	+	pept.	—			+	jaune rougeâtre.
B. giganteus (Kern).	—	+	+		+					+	jaune rougeâtre.
Microc. Biskra (Heydenreich).	—	+	+	+	+		—			+	jaune ou bleu
B. pseudomycoïdes (Migula)	—	+	+	+	+					+	rouge.
B. murisepticus (septicémie des souris, Flügge).	—	—	∓	+	+	—	—	—	—	—	Path souris et pigeons.
B. rhusiopathiæ suis (Rouget du porc. Pasteur Thuillier, Löftler)	—	—	∓	+	+	—	—	∓	—	—	Path. porcs, lapins, pigeons.
B. liquefaciens bovis (Arloing).	—	—	+	+?	+					—	Path. bœuf.
B. buccalis (leptothrix, Robin).	—	—	+		+					—	
Micro. aerogenes (Miller).	—	—	+	+	+		+			—	
Micro. ureæ liquefaciens (Leube)	—	—	+	+	+		+			—	Ferm. urée.
Micro. lactis (Kozai).	—	—	∓	+	+	+	—			—	
Micro. acidi lactici (Krueger).	—	—	∓	+	+	+				—	
Micro. amarificans (lait amer, Cohn).	—	—	+		+	+	+			—	
Micro. albus (Matzuschita).	—	—	+	+	+	+	—	—	+	—	
Micro. pyogenes albus (Staphylocoque, Rosenbach).	—	—	+	+	+		—	—	—	—	
Micro. ovis (mammite contagieuse, Nocard). . .	—	—	+	+	+					—	Path brebis.
Micro. influenzæ (Fischel).	—	—	+	+	+	—				—	Path. cheval et chien.

Streptoccus coli gracilis (Escherich)	—	—	+	+	+	+				—	Non path.
Strep. ureæ trifoliatus (Rovsing)	—		∓		+					—	
Strep. albus (de l'eau) (Maschek)	—		+		+					—	
Strep. septicus liquefaciens (Babès)	—	—	+	+	+					—	Path. souris et lapins
B. orchiticus (Kustcher, pseudo-morve)	—	—	+	+	+	—				+	orange ; path cobayes.
B. coronatus (Keck)	—	—	+		+					+	jaune d'or.
B. fulvus (Zimmermann)	—	—	+	+	+					+	jaune rouge.
Micro. citreus conglomeratus (Bumm)	—	—	+	+	+					+	jaune.
Micro. radiatus (Flügge)	—	—	+	+	+					+	jaune.
Micro. citreus liquefaciens (Unna)	—	—	∓	+	+					+	jaune.
Micro. luteus liquefaciens (Adametz)	—	—	+	+	+	∓				+	jaune.
Micro. subfuscus (Matzuschita)	—	—	+	+	+	+	—	—	—	+	jaune soufre.
Micro beriberi (Pekelharing)	—	—	+		+					±	tardivement jaune
Micro. subflavus (Bumm)	—	—	+	+	+					+	jaune ; quelquefois path. homme.
Micro. flavus conjonctivæ (Gombert)	—	—	+	+	+					+	brun jaunâtre.
Micro. Beckeri ; osteomyélite (Becker)	—	—	+	+	+	+	—	+	∓	+	jaune orange.
Micro. pyogenes aureus ; staphyl (Rosenbach)	—	—	+	+	+	+	—	+	∓	+	jaune orange.
Micro. pyogenes citreus staphyl. (Rosenbach)	—	—	+	+	+	+	—	+	∓	+	jaune citron.
Micro. salivarius pyogenes (Biondi)	—	—	+	+	+					+	jaune d'or.
Strep. coli brevis (Escherich)	—		+		+					+	jaune.
Sarcina lutea (Flügge)	—	—	+	+	+	+	—	∓	∓	+	jaune.
Sarcina aurantiaca (Koch)	—	—	+	+	+	+	—	—	∓	+	jaune orange.
Sarcina aurea (Macé)	—		+		+					+	jaune d'or.
B. erythrogenes lactis (lait rouge, Hueppe)	—	—	+	+	+	+	—	∓	+	+	rouge.
Micro. tetragenes ruber (Bujwid)	—		+		+					+	rouge.
Micro roseopersicinus (van Ermengem)	—	—	+	+	+					+	rose.
B. mallei (morve, Loeffler et Schütz)	—	—	+	—	+	+	—	∓	∓	+	brun.
II. — Anaérobies liquéfiant la gélatine.											
B. fœtidus (Liborius)	+	+	—	+	+		+			—	
B. liquefaciens magnus (Lüderitz)	+	+	—	+	+		+			—	Non path.

	Mobilité	Formation des spores	Aérobiose	Col. par le Gram.	Liq. de la gélat.	Coag. du lait	Fermentation du glucose	Réd. des sulfates	Indol	Pigments colorés	Observations
B. acidi butyrici (Kedrowski)	+	+	—	+	+	+	+			—	
B. œdematis (Liborius)		+	—		+					—	
B. butyricus (Botkin)	+	+	—	+	+	+	+			—	
B. pseudotetanicus (San Felice)	+	+	—	+	+	—	+	+	+	—	
B. tetani (Nicolaier)	+	+	—	+	+	—	+	+	±	—	Tétanos
B. botulinus (van Ermengem)	+	+	—	+	+	—	+		+	—	Path.
B. enteritidis sporogenes (E. Klein)	+	+	—	+	+	pept	+			—	Path. souris et homme.
B. pseudo-œdematis (Liborius)	+	+	—		+		+			—	Path souris, lapins.
B. Chauvœi (Arloing, charbon symptomatique)	+	+	—	—	+	+	+		+	—	Path. cobayes, bœufs.
B. œdematis maligni (vibrion septique, Pasteur)	+	+	—	—	+	+	+		+	—	Path.
III. — Aérobies facultatifs, ne liquéfiant pas la gélatine.											
B. putrificus coli (B. III, Bienstock)	+	+	±		—				+	—	
B. septicus vesicæ (Clado)	+	+	+	+	—					±	brunâtre ; path. souris, cobayes, lapins.
B. tussis convulsivæ (Afanassiew)	+	+	+		—					±	jaunâtre ; path. pigeons, chien, lapins
B. bronchitidis putridæ (Lumniczer)	+	+	+	+	—	+	—			—	Path.
B. diphteriæ colombarum (Löffler)	—	+	+	—	—	—			—	—	Path. souris, pigeons, cobayes, poules.
B. proteus Zenkeri (Hauser)	+	—	+	+	—		+		—	—	Path.
B. proteus Zopfii (Kurth)	+	—	±	+	—	—		+	—?	—	

B. proteus lætalis (gangrène pulmonaire, Babès)	+	—	±	+	—					+	brun ou jaunâtre ; path. souris, lapins.
B. muripestifer (Laser)	+	—	+	+	—	+	+	+		+	brun.
B. endocarditis griseus (Weichselbaum)	+	—	+	+	—					+	jaune gris ; path. cob., souris.
B. aurantiacus (Frankland)	+	—	+		—				+	+	jaune orange
B. nitrogenes (dénitrifiant, Burri et Stutzer)	+	—	±		—		+			+	rouge.
Micr. citreus agilis (Menge)	+		+		—					+	jaune.
B. pseudotuberculosis (A. Pfeiffer)	+	—	+	—	—	—				—	Path. rongeurs.
B. coli communis (Escherich)	+	—	+	—	—	+	+	+	+	—	Path.
B. Shiga (dysenterie)	+	—	+	—	—	—	—		—	—	Path.
B. brassicæ acidæ (choucroute, Lehmann et Conrad)	+	—	±	—	—	+	+			—	
B. enteritidis Gaertner	+	—	+	—	—	+	+		—	—	Path.
B. Friedbergensis (Gaffky et Paak, intoxication par la viande)	+	—	+	—	—	—	+		—	—	Path.
B. fœcalis alcaligenes (Petruschky)	+	—	+	—	—	—	—		—	—	
B. typhosus (Eberth-Gaffky)	+	—	+	—	—	—	—	+	—	—	Path.
B. typhi murium (Lœffler)	+	—	+	—	—	—	+	+		—	
B. suipestifer, peste porcine (Salmon, Smith)	+	—	±	—	—	—	+	+	—	—	
B. cuniculicida mobilis (Septicémie du lapin) (Eberth et Mandry)	+	—	+	—	—	+			+	—	Path. moineau, souris, cobayes, lapins.
B. canariensis (Rieck)	+	—	±	—	—	+			+	—	Path. canaris, souris.
B. diphteriæ avium (Loir et Ducloux)	+	—	+	—	—	+			+	—	Path. oiseaux, lapins, cobayes, veaux
B. denitrificans agilis (Ampola et Garino)	+	—	±	—	—	—	+		—	—	
B. crassus pyogenes bovis (Lucet)	+		+		—					—	Path. cobayes.
B. lactis flavus (Peters)	—	—	+	—	—					+	jaune
B. denitrificans (I. Stutzer et Burri)	+	—	+		—		+		+	+	brun rouge fluores.
B. fluorescens putridus (Flügge)	+	—	+	—	—					+	vert fluores.
B. cyanogenus lactis (Ehrenberg)	+	—	+	—	—		—	+		+	bleu.
B. rubrum (Migula)	+	—	+		—					+	rouge.

	Mobilité	Formation des spores	Aérobiose	Col. par le Gram.	Liq. de la gélat.	Coag. du lait	Fermentation du glucose	Réd. des sulfates	Indol	Pigments colorés	Observations
B. rubefaciens pyogenes (Matzuschita)	+	—	+	—	—	—	—	+	+	+	rouge ; path. cobayes
B. viscosus lactis (Adametz)	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—	
B. fœcalis (Bienstock)	—	+	+	+	—					—	
B. coprogenes fœtidus (Schottelius et Lydtin)	—	+	+	+	—					—	
B. viscosus cerevisiæ (von Laer)	—	+	+		—	—	+			—	
B. acidii lactici (Hueppe)	—	+	±	—	—	+	+	—	+	—	
B. phosphorescens (Fischer)	—	—	±	+	—					—	
B. phosphorescens gelidus ou Flugeri (Förster-Beyerinck)	—	—	+	+	—					—	
B. capsulatus septicus (Bordoni-Uffreduzzi)	—	—	+	+	—	—	+		—	—	Path. souris, lapins, cobayes, chiens.
B. rhinoscleromatis (Frisch)	—	—	±	+	—	±	+	+		—	Path. souris.
B. diphteriæ (Klebs-Lœffler)	—	—	+	+	—	—	—	±	+	—	Path.
B pseudodiphtericus (Hoffmann)	—	—	+	+	—	—	—	∓	+	—	
B. pseutuberculosis murium (Kustcher)	—	—	+	+	—					—	Path. souris.
B. leucœmiæ bovis (Lucet)	—	—	+	+	—					—	Path. cobayes.
Micro. cereus albus (Passet)	—	—	+	+	—	—		—	—	—	
Micro. ureæ (Cohn et Leube)	—	—	+	+	—					—	
Micro. lanceolatus (Dipl. pneumoniæ, Talamon Fraenkel)	—	—	+	+	—	+				—	Path.
Micr. trachomatis (Sattler et Michel)	—	—	+	+	—					—	Non path.
Micr. tetragenus (Koch et Gaffky)	—	—	±	+	—	+	—	—	—	—	Path souris, cob.
Micr. mastitidis vaccæ (mammite de la vache, Kitt)	—	—	+	+	—					—	Path.
Micr. bovis (hémoglobinurie du bœuf (Babès)	—	—	+	+	—					—	Path.

Strept. mirabilis (Roscoe et Lunt).	—	—	+	+	—					—	
Strept. caucasicus (Kefir, Freudenreich).	—	—	+	+	—	+	—			—	
Strept. kefir (Freudenreich).	—	—	+	+	—	—	+			—	
Strept. mesenteroïdes (Axscococcus, Cienkowski).	—	—	+	+	—		—			—	
Strept. pyogenes (erysipelatis, Rosenbach)	—	—	±	+	—	+	—	±	—	—	Path.
Strept. equi (coryza contagieux, Schütz).	—	—	+	+	—					—	Path. souris.
Micr. luteus (Cohn).	—	—	+	+	—					+	jaune.
Micr. aurantiacus (Cohn).	—	—	+	+	—		—			+	jaune.
Micr. cereus flavus (Passet).	—	—	+	+	—					+	jaune.
Micr. bovinus (pneumonie du bœuf, Poels-Nolen).	—	—	+	+	—					+	jaune, path.
Micr. scarlatinus (Sternberg).	—	—	+		—					+	rouge brique.
Micr. cinnabarinus ou cinnabareus (Flügge).	—	—	+	+	—					+	rouge.
Micr. cerasinus lactis (lait rouge, Keferstein).	—		+	+	—	—				+	rouge.
B. lactis aerogenes (Escherich).	—	—	+	—	—	+	+	+	—	—	Path. souris, cobayes.
B. pneumoniæ (Friedlander, Weichselbaum).	—	—	+	—	—	—	+	±	±	—	Path.
B. ozænæ (Thost).	—	—	+	—	—	—	+		—	—	Path. souris, cobayes.
B. dysenteriæ vitulorum (dysenterie des veaux, Jensen).	—	—	+	—	—		+			—	Path. veau.
B. choleræ columbarum (Leclainche).	—	—	+	—	—	+			+	—	Path. pig., lap., cob.
B. choleræ anatum (choléra des canards, Cornillet, Toupet)	—	—	+	—	—					—	Path. canards.
B. suisepticus (septicémie des porcs, Schütz, Salmon et Smith).	—	—	±	—	—	—	—	+		—	Path. porc, souris, oiseaux.
B. bovisepticus (Bollinger).	—	—			—					—	Path. lap., souris. bœuf, cheval, porc.
B. cuniculi pneumonicus (pneumonie des lapins, Beck).	—	—	+	—	—					—	Path. souris, lap., cob.
B. pestis bubonicæ (Yersin)	—	—	+	—	—					—	Path.
B. fungoïdes (Tschistowitsch)	—	—	±	—	—		+			—	
B. pleuropneumoniæ, pneumonie du cheval (Schütz).	—	—	+	—	—					—	Path. souris, lap., cob., cheval
B. aceticus (Mycoderma aceti ; Pasteur, Zopf, Kutzing).	—	—	±	—	—					—	
B. Pasteurianus (Mycoderma Pasteurianum Zopf).	—	—	±	—	—					—	

	Mobilité	Formation des spores	Aérobiose	Col. par le Gram	Liq. de la gélat.	Coag du lait	Fermentation du glucose	Réd. des sulfates	Indol	Pigments colorés	Observations
Micr. catarrhalis (Seifert).	—	—	+	—	—					—	
Micr. parvus (Lembke).	—	—	+	—	—	—	—		—	—	
Micr. melitensis (Bruce, fièvre ondulante).	—	—	+	—	—					—	Path. chèvre, singe. hommes.
Strept. mastitidis sporadiæ (agalaxie contagieuse, Nocard et Mollereau).	—	—	+	—	—	—	—			—	Path. vaches, chèvres
B. amylobacter (Clostridium butyricum, Prazmowski et Van Tieghem).	+	+	—	+	—		+		+	—	
B. amylozyma (Perdrix).	+	+	—		—		+			—	
B. granulobacter butyricum (Beyerinck).	—	+	—		—					—	
Strept. acidi paralactici (Nencki et Sieber).	—	—	—	+	—	+				—	
IV. — Microbes ne se développant pas au-dessous de + 20°, aérobies facultatifs.											
B. thermophilus ramosus (Sames : sol.).	+	+	±	+		—			+	—	
B. thermophilus aerophilus (Sames).	+	+	+	+		—			+	—	
B. thermophilus terrestris (Sames).	+	+	±	+		—			+	—	
B. thermophilus aquatilis liquefaciens (Michaelis).	+	+	±	+	+		—		—	—	
B. Pasteuri (Miquel, Urobacillus).	+	+	+	+	+					—	
B. europaæ (Nitrosomonas, Winogradsky).	+	—	+							—	transforme AzH^3 en nitrites.
B. javaniensis (Nitrosomonas, Winogradsky).	+	—	+							—	
B. thermophilus albus (Rabinowitsch).	—	+	±							—	

B. Nocardi (Farcin du bœuf de la Guadeloupe Nocard)	—	+	+	—			—			+	jaunâtre, path. cobayes, bœuf.
B. tuberculosis (R. Koch)	—	—	+	+	—		—	—	—	∓	Path.
B. xerosis (Neisser et Kushbert)		—	+	+						—	Non path.
B. influenzæ (R. Pfeiffer)	—	—	+	—						—	Path.
B. conjunctivitidis (Koch et Kartulis)	—	—	+	—						—	Path.
B. nitrobacter (Winogradsky)	—	—	+							—	F. nitrique.
Micr. intracellularis meningitidis (Weichselbaum)	—	—	+	—						—	Path.
Micr. nitrosus (nitrosococcus) (Winogradsky)	—	—	+	+						—	
Micr gonorrheæ (Neisser)	—	—	±	—		—				—	Path.
Micr. pemphigi (Demme)	—	—	+	+						+	jaune path., cobayes.
B. tuberculosis avium (Mafucci)	—	—	+	+	—		+	—	—	—	Path. oiseaux, lapins, porcs.
V. — Ne se développant pas au-dessous de 20°. Anaérobies.											
B. viscosus vini (Kramer)	—		—								
B. Winogradskyi (Winogradsky)			—							—	Fixateur d'azote.
B. claviformis (Tyrothrix, Duclaux)		+	—			+	+			—	
VI. — Microbes insuffisamment étudiés au point de vue de leurs caractères biologiques.											
B. radicicola. (Nodosités des légumineuses, Beyerinck)		—	+		—					—	
B. lepræ (Hansen)	—	+		+							
B. smegmatitis (Alvarez et Tavel)	—			+							

IX. — Tableau type pour la détermination d'un microbe.

Désignation : N°.

Origine :
Mode d'isolement :
Forme et disposition des éléments :
Motilité : Cils :
Capsule : Spores :
Formes d'involution :
Caractères de coloration :
Gram : Acido-résistance :
Dimensions des éléments :
Action de l'oxygène :
T. Optimum : T. mortelle :

Caractères des cultures. — Bouillon ordinaire :
Bouillon Martin :
Bouillon glucosé :
Bouillon ascite :
Bouillon/sérum :
Bouillon lactique 2 ‰ : Bouillon lactique 5 ‰, glucosé 5 ‰ :
Lait :
Lait tournesolé : *Présure* :
Gélatine. - Colonies sur plaques :
Gélatine. — Piqûre :
Gélose ordinaire. — Colonies sur plaques :
Gélose ordinaire. — Strie :
Gélose ordinaire. — Piqûre :
Gélose glucosée. — Colonies et strie :
Gélose glucosée (Veillon). Tubes profonds. — Colonies :
Gélose glucosée nitratée. — Colonies :
Gélose ascite inclinée :
Gélose au sang inclinée :
Sérum coagulé :
Pomme de terre :
Pomme de terre glycérinée :
Gélose de Sabouraud :
Carotte :
Navet :
Bouillon de haricots (Mazé) :
Eau de Malt :
Gélatine à la Maltopeptone (glucose, acide) :
Sol. de Maltopeptone 10 ‰ + Saccharose 10 % :
Sang défibriné :
Urine :
Gélose de Conradi-Drigalski :
Eau peptonée (p. pancréatique Defresne) : réaction :
Eau peptonée glucosée 10 ‰ : réaction limite en SO^4H^2 ou NaOH par litre :
Lactosérum (présure) :
Gélose glycérinée :
Gélatine au bouillon de harengs, salé 30 0/00 :
Empois d'amidon : *Maltose* *Glucose.*
Milieu de Gessard (Succinate NH^4) :
Gelée de silice (Beyerinck) :
Liquide de Uschinsky :
Liquide d'Oméliansky avec cellulose :
Liquide Raulin :
Gélose : $PO^4K^2H + SO^4Mg + CO^3Ca$: Gélose + $PO^4K^2H + SO^4Mg + CO^3Mn$:
Ascite anaérobie (Noguchi) :

Caractères biochimiques : Pouvoir protéolytique :
Gélatine : Blanc d'œuf coagulé Sérum coagulé Caséine
Pouvoir acidaminolytique : Développement sur milieux d'isolement (A. Berthelot), 4ᵉ passage, culture de 48 heures.

Tyrosine	Tryptophane	Ac. Glutamique	Proline
Histidine	Leucine	Ac. Aspartique	Arginine
Alanine	Glycocolle	Phénylalanine	Lysine

Solution de peptone de soie (H. Laroche) à 1 %.
Solution d'éreptone (Hoechst) à 1 %.

Développement en solution saline (PO^4K^2H, SO^4Mg $CaCl^2$) dans lequel N est fourni par 2 0/00 d'une des substances suivantes :

Urée : Allantoïne : Caféine : Créatine :

Action sur les hydrates de carbone : Réaction au tournesol des cultures (4 jours) en eau peptonée additionnée d'un des corps suivants :

Glucose	Mannite	Arabinose	Glucosamine
Lévulose	Dulcite	Xylose	Salicine.
Galactose	Erythrite	Mannose	Amygdaline
Saccharose	Dextrine	Raffinose	Arbutine
Lactose	Amidon	Rhamnose	Esculine
Maltose	Inuline	Sorbite	Méthylglucoside α
Glycérine	Glycogène	Inosite	Méthylglucoside β.

Remarques sur les cultures ci-dessus :
Action sur l'acide lactique (C fourni par un lactate)
Action sur les nitrates : *Nitrites* : *Ammoniaque* :
Action sur le rouge neutre (eau peptonée) :
Pigments :
Corps microbiens en masse (méthode de Maurice Nicolle) (culture de 24 h.). — Aspect :
Rendement : H^2O %.
Action de la bile ou des sels biliaires :
Action de la pipéridine :
Action sur les graisses : Gélose ordinaire + beurre (plaques) :
Gélatine ordinaire + beurre (plaques) :

Produits formés aux dépens des protéiques ou de leurs constituants :
Milieux au tryptophane :
Indol : *Scatol* : *Ac. indolacétique* :
Mil. à la tyrosine : *Phénol* :
p. Crésol *Oxyacides* : *P. oxyphényléthylamine* :
Mil. à l'histidine :
Imidazoléthylamine :
Milieux à l'arginine : *Putrescine*
Sol. de peptone pancréatique (Defresne) : *H^2S* : *Mercaptans* : *NH^3*
Amines volatiles *Acides volatils* *Urée* :
Mil. au blanc d'œuf coagulé, à la gélatine, au sérum ou à la caséine :
Produits formés aux dépens des hydrates de carbone ou de leurs dérivés :
(Eau de peptone glucosée) *Alcool éthylique* : *Aldéhydes* :
Acétone : *Alc. propylique* : *Alc. butylique normal* :
Alc. isobutylique : *Alc. amylique* : *Alc. méthylique* :
Dioxyacétone : *Acetylméthylcarbinol* : *Butylène-glyco* :
Acide formique : *Ac. acétique* : *Ac. propionique* :
Ac. butyrique : *Ac. valérianique* : *Ac. caproïque* : *Ac. succinique*
Ac. lactique droit : *Ac. lactique gauche* : *Ac. oxalique* :
CO^2 : *H* : *CH^4* :
Acide pyruvique *Acide β oxybutyrique* :

Pouvoir pathogène. — Cultures totales en bouillon (24 h.) :
Souris : Inj. sous-cut. Inj. int.-périton.
Cobaye : Inj. sous-cut. Inj. int.-périton. Inj. int.-veineuse
Lapin : Inj. sous-cut. Inj. int.-périton. Inj. int.-veineuse
Corps microbiens (24 h).
Poisons solubles (Cult. en bouillon Martin, 10 jours). — Toxine.
Subst. alcaloïdiques (sol. alcool).
Endotoxine (corps microbiens 24 h.).
Hémolysine (bouillon + globules 24 h.).

Cultures en milieux spéciaux.

Observations :

Notes cliniques :

Date :

D'après *A. Berthelot* (Institut Pasteur).

CHAPITRE XI

RECETTES UTILES DANS LES LABORATOIRES

A. — Fermeture et étiquetage des vases ou flacons.

1° *Mastic pour luter les flacons contenant des pièces anatomiques.*

Caoutchouc (fragments de vieux tubes). . .	200 gr.
Suif ou paraffine fusible à 40-50°.	125 gr.
Talc de Venise.	200 gr.

Dans le suif fondu à une douce chaleur, on jette les fragments de caoutchouc. On laisse fondre lentement, en agitant de temps en temps, puis on ajoute le talc. Le mélange refroidi se conserve indéfiniment. Il faut le chauffer pour s'en servir et le porter avec une baguette sur les joints qu'on désire luter.

Ce mastic est inattaquable par l'alcool. Ou bien :

Glu marine.

Faire macérer pendant 3 ou 4 jours 1 partie de caoutchouc et 3 parties d'huile de goudron. Décanter le liquide et y faire fondre à chaud 3 parties de gomme laque. Couler dans des moules. La masse se solidifie à froid. Cette glu est très recommandable pour luter les flacons bouchés au liège. Elle forme un enduit très solide et imperméable à l'humidité.

On peut aussi luter les flacons qui renferment de petites pièces anatomiques ou d'autres pièces de collection (insectes, vers, etc.), en recouvrant le bouchon avec l'un des luts suivants :

a) On fait une bouillie avec du silicate de soude commercial et du kaolin pulvérisé. On l'applique sur les bouchons et on laisse sécher.

b) On gâche du plâtre avec de l'eau contenant 5 p. 100 de

gomme arabique. La bouillie devient solide en une demi-heure et très adhérente.

c) On mélange :

Silicate neutre de soude	1 partie.
Magnésie calcinée	1 partie.
Oxyde de zinc	1 partie.

Appliquer et laisser sécher. Ce lut constitue un mastic avec lequel on peut coller les objets de porcelaine et qui supporte la cuisson au four.

Lut de Krönig. (Pour border les préparations en milieux liquides) :

Faire fondre 20 grammes de cire jaune dans une capsule de porcelaine. Y ajouter peu à peu 80 grammes de colophane en agitant avec une baguette de verre. Lorsque la masse est bien homogène, couler dans de petites boîtes métalliques. Ce lut fond au contact d'un fer chaud. Il est adhérent au verre sec et durcit très rapidement.

2° *Encre pour écrire sur le verre* :

A 100 centimètres cubes d'encre ordinaire ou d'encre de Chine liquide, on mélange 20 centimètres cubes de solution commerciale de silicate de soude.

Avec cette encre silicatée on écrit, comme on le ferait sur du papier, au moyen d'une plume ordinaire qu'on prendra soin de laver chaque fois dans l'eau, car, après dessiccation, les becs ne se sépareraient plus.

3° *Imperméabilisation des étiquettes.*

On la réalise très simplement en les recouvrant au pinceau d'une couche de paraffine fondue.

4° *Gélatine gélosée pour polycopie* :

Eau	400 cc.
Gélose	8 gr.

Laisser tremper 24 heures. Passer à l'autoclave à 120°, puis, dans le mélange fondu, ajouter :

Gélatine	80 gr.
Glycérine	600 gr.
Glucose	100 gr.
Talc	25 gr.

Couler dans une large cuvette à photographie en passant sur tarlatane ou sur un tamis fin.

5° *Encre à polygraphie sur gélatine* :

Violet de Paris.	1 gr.
Alcool.	2 cc.
Eau.	7 cc.

Pour effacer, laver la gélatine avec un tampon d'ouate hydrophile imprégné d'eau acidulée d'un dixième d'acide chlorhydrique. Faire suivre d'un lavage à l'eau et sécher.

B. — Nettoyage des lames porte-objets usagées.

Sur la table du laboratoire, les lames et les lamelles seront conservées dans de petits vases à recouvrement remplis d'alcool à 95°. On les sort de ce liquide au fur et à mesure des besoins et on les essuie avec un linge fin.

Les lames et les lamelles usagées sont réunies dans un bocal contenant une solution de carbonate de soude à 5 p. 100. Lorsqu'elles sont assez nombreuses, on les fait bouillir pendant une demi-heure dans une capsule remplie également de solution de carbonate de soude. On les égoutte ensuite et on les reporte dans une autre capsule où l'on verse une solution acide bichromatée préparée comme suit :

Bichromate de potasse.	50 gr.
Eau.	1 litre.
Acide sulfurique ordinaire.	100 gr.

On fait bouillir de nouveau pendant 30 minutes, puis on sort les lames ou lamelles, on les lave à grande eau courante, on les égoutte et on les essuie une à une. Elles sont alors de nouveau prêtes à servir.

C. — Obturation des tubes ou vases de culture.

Cette obturation se fait le plus commodément avec des capuchons de caoutchouc qu'on peut stériliser à l'autoclave et conserver dans une solution de sublimé au millième. Mais, comme ils coûtent assez cher, on peut très bien les remplacer par l'obturation au moyen d'un mélange de 10 parties de vaseline fusible à 40° et d'1 partie de paraffine fusible à 55°, qu'on coule sur le bouchon d'ouate légèrement enfoncé dans le tube ou le goulot du vase et qu'on recouvre d'un capuchon de papier ou d'étain.

D. — Conservation et entretien des seringues et aiguilles à injection.

Les seringues à injection stérilisables par la chaleur, à piston de caoutchouc ou de fibre, doivent être maintenues constamment immergées dans un bocal à large ouverture, bouché à l'émeri et contenant une solution saturée à froid de borate de soude.

On prendra soin de talquer et de faire jouer de temps en temps les pistons.

Les aiguilles à injection en acier seront conservées indéfiniment à l'abri de la rouille si, aussitôt après qu'on en a fait usage, on les plonge dans un flacon contenant la même solution de borate de soude saturée à froid et filtrée. Chaque aiguille doit toujours être pourvue d'un fil d'argent ou de nickel, afin d'empêcher l'obturation de son canal par de petits cristaux de sel.

Il est toujours recommandable d'ajouter un peu de borate de soude à l'eau dans laquelle on fait bouillir seringues, aiguilles, bistouris, instruments nickelés divers. C'est un excellent moyen d'éviter les taches de rouille.

E. — Stérilisation des aiguilles d'acier au chloroforme paraffiné.

La stérilisation est obtenue par l'immersion dans du chloroforme paraffiné (paraffine 3 grammes, chloroforme 100 centimètres cubes) ; on taille en copeaux la paraffine et on la fait dissoudre dans du chloroforme commercial ou anesthésique.

Après une heure de séjour dans ce liquide, l'aiguille peut être considérée comme stérile, mais on peut l'y laisser indéfiniment sans dommage.

Avec une pince flambée, on la retire du tube contenant le chloroforme paraffiné. On l'introduit, pointe en bas, dans un petit tube stérile bouché avec de l'ouate. On renverse le tube fermé et on l'abandonne sens dessus dessous durant quelques minutes : l'aiguille tombe et vient s'accoler au bouchon ; son embout déverse sur le coton tout le chloroforme contenu dans sa cavité. On redresse le tube et on le

porte à l'étuve à 37°. Cette température accélère l'évaporation du liquide volatil. Deux heures suffisent pour assécher les aiguilles.

La stérilisation ne s'accompagne d'aucune oxydation de l'acier. En s'évaporant, le chloroforme abandonne un enduit minuscule de paraffine sur la paroi intérieure de l'aiguille, qui s'oppose à la coagulation du sang.

F. — Conservation des tubes et bouchons de caoutchouc.

Les objets de caoutchouc, dont on fait rarement usage, se durcissent et se fendillent à l'air et à la lumière. Il faut, pour assurer leur conservation en bon état, les tenir à l'obscurité, noyés dans du talc en poudre fine. Ils gardent ainsi leur élasticité et leur souplesse.

Pour les tubes à gaz ou à vide, dont on se sert de temps en temps seulement, il est plus simple de les tenir immergés dans un large bocal rempli d'une solution de carbonate de soude à 10 p. 1.000 qu'on change tous les deux ou trois mois.

G. — Destruction des mouches et des moustiques dans les laboratoires, les logements, les écuries, etc.

a) Lavage des planchers, carrelages et éviers au crésyl à 5 p. 100.

b) *Lait formolé*. — On met, dans des cuvettes photographiques, en couche mince, du lait additionné, par litre, de 10 centimètres cubes de solution commerciale (à 40 p. 100) de formol. Les mouches qui s'abreuvent à ce liquide ne tardent pas à succomber.

On peut préparer de la même manière de la bière formolée. Les mouches en sont très friandes.

c) *Papiers tue-mouche*.

On peut en fabriquer très facilement soi-même avec du papier buvard ou du papier d'emballage, étalé en carrés sur des assiettes ou dans des cuvettes photographiques et imbibé de la liqueur préparée comme suit :

Faire bouillir 10 grammes de bois de quassia amara dans 250 centimètres cubes d'eau. Passer et ajouter 135 grammes de mélasse ou de miel et 10 grammes d'émétique (tartrate de potasse et d'antimoine).

d) *Cobolt* (arsenic métallique réduit en poudre fine et qui, par son contact avec l'air, subit rapidement un commencement d'oxydation).

On étale cette poudre en couche mince dans des assiettes ou des cuvettes photographiques sur un papier buvard que l'on maintient mouillé avec une très petite quantité d'eau. Elle est très toxique pour les mouches.

(On trouve le Cobolt chez Poulenc frères.)

e) *Vapeurs de crésyl chauffé* (méthode de *Bouët* et *Roubaud*, recommandée pour les écuries, salles d'animaux, etc.).

Dans un récipient métallique un peu profond, une vieille marmite par exemple, on fait bouillir, sur une lampe à pétrole ou à alcool, une quantité de crésyl pur correspondant à 5 grammes de crésyl par mètre cube d'espace à traiter.

f) *Tabac* (méthode préconisée par *Simond* et par *Thiroux*), *Soufre, Pyrèthre, Quinoléine.*

On détruit facilement les moustiques d'une case indigène en enveloppant celle-ci d'une vaste bâche en toile et en faisant brûler à l'intérieur, sur un petit réchaud contenant du charbon de bois bien allumé, 20 grammes de tabac en feuilles (ou de tabac à fumer) par mètre cube. Après une heure de contact, tous les moustiques sont tués.

On obtient le même résultat avec 5 grammes de soufre en canons ou en fleur par mètre cube, ou 10 grammes de poudre de pyrèthre, ou mieux avec un mélange de 10 grammes de tabac et de 10 grammes de poudre de pyrèthre.

La poudre de pyrèthre seule donne, par sa combustion, des vapeurs qui stupéfient les moustiques, mais qui ne les tuent que difficilement.

Les vapeurs de quinoléine à la dose de 0 gr. 50 par mètre cube tuent également bien les mouches et les moustiques dans les locaux mal fermés, après 2 heures de contact (*J. Legendre* et *G. Bourret*).

g) *Huile de schiste,* recommandable pour la destruction des larves de mouches dans les fumiers et fosses d'aisances.

On l'utilise en émulsion à 5 p. 100 dans l'eau, projetée avec un balai de brindilles ou avec une pompe à pulvérisation.

Pour les fosses à purin ou d'aisances, il faut employer 10 litres de schiste par mètre cube de fumier ou d'ordures.

Nota. — Pour la défense contre les poux, puces, punaises, tiques, etc., voir le chap. XLIX.

H. — Teinture noire lavable pour les tables en bois des laboratoires.

Cette teinture doit être appliquée, autant que possible, sur le bois neuf bien uni, ou après dégraissage soigneux à l'essence de pétrole.

On effectue un premier et abondant badigeonnage avec une solution aqueuse à 10 p. 100 de chlorhydrate d'aniline tiède. On renouvelle le badigeonnage après quelques heures.

On laisse sécher. Le lendemain, on applique une couche de solution de 100 grammes d'acide chromique dans un litre d'eau tiède. A défaut d'acide chromique, on peut employer un mélange de 120 grammes de bichromate de potasse, 241 grammes d'acide sulfurique à 66° B^e^ et 1 litre d'eau. Il se produit du sulfate de potasse avec mise en liberté d'acide chromique.

Le bois est ainsi teint dans sa profondeur en noir d'aniline qui résiste à la plupart des agents décolorants.

Après un ou deux jours, on lave à l'eau chaude, on laisse bien sécher et on imperméabilise le bois en le frottant avec des déchets de coton imprégnés de paraffine chaude, fondue.

CHAPITRE XII

DOCUMENTS CHIMIQUES. — RÉACTIFS UTILES DANS LES LABORATOIRES.

A. — Solutions normales et décinormales d'alcalis et de divers sels.

Les solutions dites *normales* contiennent, par unité de volume du dissolvant, un poids de substance active égal à l'équivalent chimique de celle-ci, par exemple : 40 grammes par litre d'eau distillée pour la soude caustique ; 56 gr. 100 pour la potasse caustique ; 53 grammes pour le carbonate de sodium anhydre.

La *solution décinormale de soude* est préparée en dissolvant 4 grammes (exactement 3 gr. 97) de soude caustique pure dans 1 litre d'eau distillée. 1 centimètre cube de cette solution décinormale doit être exactement neutralisé par 1 centimètre cube de solution décinormale d'acide oxalique et contient 0 gr. 004 d'hydrate de soude.

La *solution décinormale de potasse* est préparée en dissolvant 5 gr. 61 de potasse caustique pure dans 1 litre d'eau distillée. 1 centimètre cube de cette solution doit être neutralisé par 1 centimètre cube de solution décinormale d'acide oxalique et contient 0 gr. 0065 de potasse caustique.

La *solution normale de carbonate de sodium* est préparée en dissolvant 53 grammes de carbonate de sodium pur dans 1 litre d'eau distillée.

La *solution normale d'ammoniaque* = 16 gr. 93 par litre.

Solution décinormale de permanganate de potasse = 3 gr. 5 par litre (conserver en flacon jaune).

Solution décinormale de nitrate d'argent = 16 gr. 868 par litre. 1 centimètre cube de cette solution = 0 gr. 003518 de chlore ou 0 gr. 0058 de chlorure de sodium.

B. — Solutions acides normales :

Acide chlorhydrique	36 gr. 18	par litre.
» sulfurique.	48 gr. 67	» »
» azotique.	63 gr.	» »
» oxalique.	62 gr. 55	» »

(Conserver à l'abri de la lumière.)

C. — Réactifs divers d'usage courant.

Acide chlorhydrique pur B^e 1,2.					
» » dilué. .	200 gr.	pour	800	d'eau	distillée.
» azotique pur, B^e 1,39.					
» » dilué. . . .	200 gr.	»	800	»	»
» sulfurique pur B^e 1,83.					
» » dilué. . .	100 gr.	»	900	»	»
» acétique dilué : acide cristallisable. . . .	300 gr.	»	700	»	»
Hydrate de soude.	10 gr.	»	90	»	»
» de potasse. . . .	10 gr.	»	90	»	»
» de baryte	10 gr.	»	190	»	»
Ferricyanure de potassium. .	10 gr.	»	190	»	»
Ferro » » .	10 gr.	»	90	»	»
Chlorure de calcium. . . .	10 gr.	»	90	»	»
Chromate de potassium . .	10 gr.	»	190	»	»
Sulfocyanure de potassium. .	10 gr.	»	90	»	»
Sulfate de cuivre.	10 gr.	»	90	»	»
» de magnésium. . . .	10 gr.	»	90	»	»
Acétate de sodium.	10 gr.	»	90	»	»
Carbonate de sodium. . . .	20 gr.	»	80	»	»
Phosphate de sodium. . . .	10 gr.	»	190	»	»
Chlorure de fer.	10 gr.	»	100	»	»
Nitrate d'argent	10 gr.	»	190	»	»
Bichlorure de mercure. . .	10 gr.	»	190	»	»
Acétate plombique.	10 gr.	»	190	»	»

Eau de chaux. — Déliter 10 grammes de chaux vive avec environ 50 centimètres cubes d'eau distillée. Délayer dans 300 à 400 centimètres cubes d'eau en agitant. Laisser reposer 12 heures et décanter le liquide surnageant qu'on remplace par 1 litre d'eau distillée. Conserver en flacon bien bouché.

Eau iodée. — Eau distillée saturée d'iode en paillettes.

D. — Indicateurs colorés des réactions chimiques.

Phénolphtaléine. — Solution à 1 p. 100 dans l'alcool à 95° (incolore en milieu acide ; rouge vif en milieu alcalin). Ne doit pas être employée en présence d'ammoniaque.

Teinture de tournesol. — On peut la préparer soi-même avec du tournesol en pains dont on prend 100 grammes qu'on pulvérise finement. On fait bouillir cette poudre avec de l'alcool à 85° qu'on jette ensuite. La poudre, recueillie sur une toile, est mélangée à 600 ou 800 centimètres cubes d'eau. On chauffe à l'ébullition dans une capsule, puis on filtre au papier. On ajoute au liquide filtré son volume d'alcool à 85° et on divise en deux parties.

A la moitié de cette teinture on ajoute goutte à goutte de l'acide chlorhydrique jusqu'à ce que la coloration soit presque rouge, et on réunit à l'autre moitié pour avoir la teinte sensible. On y trempe le papier pour l'avoir *bleu.* Pour l'avoir *rouge*, on le trempe dans une solution très faible d'acide chlorhydrique et on fait sécher.

Papier d'amidon.

Amidon.	1 gr.
Eau distillée.	100 cc.

Faire bouillir ; décanter après refroidissement. Tremper dans cette solution des feuilles de papier à filtrer qu'on fait sécher et qu'on découpe en bandelettes.

Papier à l'acétate de plomb.

Tremper des feuilles de papier à filtrer dans une solution à 1 p. 10 d'acétate neutre de plomb. Faire sécher et découper en bandelettes. Ce papier est noirci par les sulfures et par l'hydrogène sulfuré.

Solution de méthylorange (hélianthine, orange III ou diméthylorange).

Solution aqueuse à 1 p. 1.000. Jaune en milieu alcalin ; rouge en milieu acide. Ne doit pas être employée en présence des acides organiques.

Solution de nitroprussiate de sodium à 1 gramme p. 20 d'eau distillée.

Coloration violette par les sulfures. Pas de coloration par l'hydrogène sulfuré.

E. — Principaux dissolvants des matières grasses, cires et résines.

	Points d'ébullition à la pression barométrique de 760 mm.
Ether sulfurique.	35°
Sulfure de carbone.	46°

Ethers de pétrole.	50° à 75°
Acétone.	56°
Chloroforme	61°
Alcool méthylique.	66° à 67°
Tétrachlorure de carbone.	78°1
Alcool éthylique.	78°4
Benzol (Benzène).	80°3
Toluène.	111°
Alcool amylique.	137°
Xylol (Xylène).	142°
Essence de térébenthine (térébenthène).	160°
Essence de cèdre.	237°

F. — Réactif de la cellulose (*chloroiodure de zinc*).

A 25 ou 50 centimètres cubes de solution sirupeuse de chlorure de zinc du commerce (45° B^e^), on ajoute 1 à 2 grammes d'iodure de potassium cristallisé et quelques paillettes d'iode.

On chauffe dans une capsule, à feu nu, en agitant, pour concentrer la solution. De temps en temps on prélève une goutte qu'on dépose sur une feuille de papier à filtrer. Lorsque la concentration est suffisante, il se produit rapidement une tache bleue intense.

Si la coloration tarde à se manifester, on prolonge un peu l'évaporation, mais il ne faut pas que celle-ci soit poussée trop loin, car le réactif perdrait son action colorante et, pour la lui restituer, il serait nécessaire de le diluer d'un peu d'eau. La réaction est plus intense à chaud qu'à froid.

G. — Réactifs des matières grasses.

Solution d'acide osmique à 1 p. 100 (colore les gouttelettes huileuses en noir intense : réduction de l'acide osmique par l'oléine).

Pour les matières grasses d'origine végétale, le réactif de choix est l'orcanette acétique qu'on prépare comme suit :

On épuise 10 grammes de racine d'orcanette pulvérisée au moyen d'alcool à 90° jusqu'à ce qu'on ait obtenu 50 centimètres cubes de teinture. A celle-ci, on ajoute 5 centimètres cubes d'acide acétique cristallisable et 32 grammes d'hydrate de chloral dissous dans 32 centimètres cubes d'eau. On laisse déposer 24 heures et on filtre.

Les globules gras ou les gouttelettes d'essence se colorent en rouge. Si l'on traite la préparation par l'alcool à 90° qui dissout et élimine les essences, la coloration ne porte plus que sur les corps gras.

H. — Caractères et réactions colorées des albumoses et des peptones.

Les albumoses et les peptones sont solubles dans l'eau et non coagulables par la chaleur. Les hétéro-albumoses ne se dissolvent qu'en présence d'une petite quantité de sels neutres.

Les albumoses se précipitent de leurs solutions aqueuses, acidifiées par l'acide acétique, par saturation avec le sulfate d'ammonium. Les peptones ne précipitent pas dans ces conditions.

Pour déterminer le degré de pureté d'une peptone commerciale, on en dissout 5 à 10 grammes dans 50 centimètres cubes d'eau, on acidule avec deux gouttes d'acide acétique et on ajoute, dans le liquide, du sulfate d'ammonium pulvérisé, en agitant pour favoriser la dissolution. Quand il reste un petit excès de sel non dissous, la saturation est complète et la presque totalité des albumoses est précipitée. On filtre et, dans le liquide, on recherche la présence des peptones vraies par la réaction du biuret (indiquée plus loin).

Le précipité resté sur le filtre est lavé avec une solution saturée de sulfate d'ammonium, puis égoutté et essoré entre des feuilles de papier à filtrer. On le redissout ensuite dans quelques centimètres cubes d'eau. On y retrouve les caractères des albumoses primaires ou secondaires. (Voir le tableau ci-après d'après *Gab. Bertrand* et *P. Thomas.*)

Le sérum du sang de cheval ou de bœuf renferme de 7 à 8 p. 100 de protéines, dont 4,5 p. 100 de globuline et 3 p. 100 d'albumine environ. On peut séparer la globuline en additionnant le sérum (en agitant constamment) d'un volume égal de solution de sulfate d'ammonium saturée, à la température de 50 à 60°, puis filtrée et abandonnée au refroidissement. Le précipité de globuline peut être recueilli sur un filtre, lavé avec la même solution et essoré. La globuline, redissoute dans la plus petite quantité possible d'eau tiède, peut être isolée par dialyse.

Réactions des Protéines, Albumoses et Peptones.

	PROTÉINES.	ALBUMOSES.		PEPTONES.
		Primaires.	Secondaires.	
Chaleur (en milieu légèrement acétique).	Coagulation.	Pas de coagulation.	Pas de coagulation.	Pas de coagulation.
Sulfate d'ammonium.	Précipité en milieu neutre.	Précipité à 1/2 saturation en milieu acétique.	Précipité à saturation en milieu acétique.	Pas de précipité.
Acide nitrique	Coagulation.	Précipité soluble à chaud, reparaît à froid.	Pas de précipité.	id.
Ferrocyanure de potassium et acide acétique	Précipité blanc.	id.	id.	id.
Acétate de cuivre.	Coagulation.	Précipité bleu.	id.	id.
Chlorure mercurique (sol saturée.	id.	Précipité blanc.	Précipité blanc.	Précipité blanc en partie.
Acétate de plomb.	id.	id.	id.	id.
Acide picrique (sol. saturée).	Précipité jaune.	Précipité jaune.	Précipité jaune.	Précipité jaune dans sol. concentrées.
Acide phosphotungstique en milieu sulfurique.	Précipité blanc.	Précipité blanc.	Précipité blanc.	Précipité blanc.

Le liquide dont on a précipité la globuline, additionné de sulfate d'ammonium pulvérisé, jusqu'à saturation, donne un nouveau précipité blanc qu'on peut recueillir et laver comme la globuline : c'est la sérum-albumine.

Préparation de peptone avec les caillots de sang de cheval, d'après *Ruppel*.

On dessèche des caillots de sang de cheval dans le vide et on les conserve à l'état de poudre grossière. 100 grammes de cette poudre sont placés dans 2 litres d'eau avec 1 gramme de pancréatine, préparée avec du pancréas de bœuf. Ajouter un peu de solution alcoolique de thymol (quelques gouttes) et 10 centimètres cubes de chloroforme. Agiter un instant. Laisser à l'étuve à 37° pendant au moins 5 jours (ou davantage). Filtrer. Evaporer au bain-marie, jusqu'à réduction à 1 dixième du volume primitif, soit 200 grammes. Précipiter par 1 litre d'alcool à 90°. Laver sur le filtre avec alcool et dessécher rapidement dans le vide. Conserver en flacons bien bouchés. (Voir aussi : préparation de peptone d'estomac de porc (bouillon Martin, chap. v).

I. — Réactions colorées des substances protéiques.

a) *Réaction xanthoprotéique*. — A 5 centimètres cubes de solution (1 partie de blanc d'œuf par exemple et 9 parties d'eau), on ajoute 0 cc. 5 à 1 centimètre cube d'acide nitrique à 36° B^{é}. Il se forme, en général, un précipité qui se redissout en partie par chauffage. On fait bouillir pendant 1 ou 2 minutes environ. Le liquide et le précipité se colorent en jaune. L'addition d'ammoniaque à ce liquide préalablement refroidi, ou de soude caustique, fait virer la teinte à l'orangé.

Cette réaction est due à la présence de noyaux aromatiques dont les dérivés nitrés sont colorés en jaune.

b) *Réaction de Millon*. — A 5 centimètres cubes de la solution protéique, on ajoute 1 à 2 centimètres cubes de réactif de Millon et on fait bouillir doucement. Il se fait un précipité qui se colore en rouge, du rouge carmin au rouge brique. Si on continue à chauffer, il peut se décolorer et se redissoudre partiellement. On doit donc chauffer avec

beaucoup de précaution au début. Cette réaction est attribuable à la tyrosine. Le phénol la donne avec intensité. La gélatine ne la donne habituellement pas. La liqueur de Millon non diluée colore à froid, en moins d'une minute, la peau et les ongles (matières cornées) en rouge foncé.

On prépare le réactif de Millon en faisant dissoudre 1 partie de mercure dans 2 parties d'acide nitrique à 36° Bé et chauffant légèrement à la fin, s'il est nécessaire. Après dissolution complète, on étend le liquide vert de 2 volumes d'eau. On agite et on décante.

c) *Réaction du biuret.* — A quelques centimètres cubes de la solution protéique, on ajoute 1 centimètre cube de soude à 10 p. 100 pour alcaliniser fortement, puis une solution de sulfate cuivrique à 1 p. 100, goutte à goutte, avec une pipette. La première goutte donne une teinte rose violacée, qui vire au violet bleu par addition ultérieure de sulfate de cuivre. Cette coloration est due à la formation d'un composé cupro-potassique. Elle est donnée par toutes les substances protéiques, mais est surtout intense avec les albumoses, et encore plus avec les peptones.

J. — Réactifs urologiques.

a) *Liquide d'Esbach* (dosage de l'albumine).

Acide picrique.	10 gr.
Acide citrique.	20 gr.
Eau distillée.	q. s. pour 1 litre.

b) *Liqueur de Fehling.* (dosage de sucre).

Sulfate de cuivre pur et cristallisé.	34 gr. 65.
Sel de Seignette (tartrate de potasse et de soude).	173 gr.
Lessive de soude.	300 gr.
Eau distillée.	q. s. pour 1 litre.

On fait dissoudre séparément le sulfate de cuivre dans 200 centimètres cubes environ d'eau distillée, puis le sel de Seignette et la lessive de soude dans une autre portion d'eau distillée. On mêle, on porte à l'ébullition pendant 10 minutes, on laisse refroidir et on complète le volume à 1 litre. (Conserver à l'abri de l'air, de la lumière, et en plusieurs flacons remplis et soigneusement bouchés).

Chaque centimètre cube de cette liqueur doit être réduit par 0 gr. 005 de glucose.

c) *Diazo-réaction d'Ehrlich* (réaction xanthoprotéique).

Diméthylaminobenzoaldéhyde. .	1 gr.
Acide chlorhydrique.	25 gr.
Eau distillée.	25 cc.

On verse quelques gouttes de ce réactif dans 4 à 5 centimètres cubes d'urine. Dans les cas positifs il se produit une coloration rouge.

d) *Dosage de l'urée dans le sang d'après la méthode de Fosse* (combinaison de l'urée avec le xanthydrol : dixanthylurée).

On prend, avec une pipette graduée, 10 centimètres cubes de sérum que l'on verse dans 100 centimètres cubes d'alcool à 95°. On ajoute quelques gouttes d'acide acétique pour acidifier le mélange. Il se forme un coagulum qui est complet après 4 heures de repos à la température du laboratoire. Ce coagulum est recueilli sur un filtre, essoré, puis lavé à 2 reprises avec 10 à 20 centimètres cubes d'alcool.

Les filtrats, réunis dans une capsule de verre de 150 centimètres cubes environ de capacité, sont évaporés doucement sur un bain-marie jusqu'à réduction du volume à 5 cc. environ. On ajoute alors, dans la capsule, 50 centimètres cubes de solution alcoolique à 5 ou 8 p. 100 de xanthydrol, puis 50 centimètres cubes d'acide acétique cristallisable.

On recouvre la capsule d'un disque de verre et on laisse en contact pendant 4 heures (au moins) à la température du laboratoire. Il ne faut pas dépasser le délai de 15 heures. Après quoi on recueille le précipité de xanthydrol sur un petit filtre exactement taré. Le meilleur filtre est un petit entonnoir cylindrique à douille capillaire, qu'on a préalablement garni d'un tampon d'ouate hydrophile et séché à 105° avant de le porter à la balance de précision. La filtration achevée, on sèche de nouveau le filtre à 105° et on pèse. La différence de poids, *divisée par* 7, donne le poids d'urée contenu dans 10 centimètres cubes de sérum mis en œuvre.

Pour le sérum humain normal, ce poids varie entre 15 et 30 milligrammes. Il s'élève à 100 dans certains états pathologiques.

K. — Préparation de la teinture de gaïac.
(Pour la recherche des oxydases.)

On fait dissoudre à chaud 5 grammes de résine de gaïac dans 70 centimètres cubes d'alcool à 95°, puis on filtre et on ajoute environ 30 centimètres cubes d'eau.

Cette teinture doit toujours être employée fraîche, car elle se peroxyde très rapidement. Il faut la tenir rigoureusement à l'abri de l'air.

En choisissant un bloc de résine, on en écartera les parties superficielles, déjà oxydées. Si la résine est impure, on la dissout d'abord dans le chloroforme ; puis on filtre et on chasse le chloroforme par évaporation dans le vide. La poudre jaune restant est alors dissoute dans l'alcool. On obtient ainsi une solution très limpide.

L. — Préparation de la pectine.
(*G. Bertrand et Mallèvre.*)

2 k. 500 de carottes nouvelles, finement broyées, sont délayées dans environ 2 litres d'alcool à 95°. On chauffe au bain-marie vers 60° pendant environ 1 heure pour dissoudre les matières colorantes, les graisses, etc. On décante l'alcool. On passe à la presse dans un linge pour obtenir un gâteau de carottes bien sec.

Ce gâteau est dissocié en menus morceaux et mis à macérer dans environ 1 litre d'acide chlorhydrique à 2 p. 100, pendant 24 heures, en ayant soin de mélanger de temps en temps. On reporte sous la presse et on retire un liquide duquel on précipite la pectine par 2 volumes d'alcool à 95°. Les flocons gélatineux de pectine décantés sont passés à travers une étoffe de laine, puis exprimés à la main. Il reste sur le tissu une masse blanche amorphe, qu'on enlève avec une spatule en corne et qu on dissout dans une très petite quantité d'eau tiède à 50°. Cette solution brute de pectine est mise à dialyser dans des sacs de collodion

pendant trois jours en changeant trois fois par jour l'eau extérieure. La pectine est alors purifiée. On peut la concentrer dans le vide à basse température. 2 k. 500 de carottes donnent environ 0 gr. 9 à 1 gr. 7 de pectine. Les solutions de cette substance, traitées par la soude caustique à 33 0/0, donnent un précipité insoluble dans l'eau, gélatineux, qu'on peut recueillir par centrifugation et laver à plusieurs reprises jusqu'à réaction neutre des eaux de lavage.

Cette pectine gélatineuse a la propriété de fixer l'alexine des sérums frais. Elle ne renferme aucune trace de matière azotée (*W. Kopaczewski* et *S. Mutermilch*).

M. — Bain-marie. Points d'ébullition de diverses solutions salines saturées.

	TEMPÉRATURE D'ÉBULLITION.	QUANTITÉ DE SEL DISSOUS A 100° DANS 100 P. D'EAU.
Sulfate de cuivre crist. . . .	102°	203 gr. 3
Chlorure de potassium. . .	103°	57
Alun d'ammoniaque crist. .	104°	422
Borax crist.	105°	201 4
Chlorure de sodium. . . .	106°	39,6
Chlorure d'ammonium. . .	112°	73
Nitrate de potasse.	113°	247
Nitrate de soude.	117°	180
Acétate de soude.	122°	204
Chlorure de calcium anhydre.	141°	156

N. — Mélanges réfrigérants de liquides et de sels à + 10°.

Chlorhydrate d'ammoniaque pulv.	5 parties	— 12°
Azotate de potassium pulv. . .	5 parties	
Eau.	16 parties	
Azotate d'ammonium pulv. . .	1 partie	— 16°
Eau.	1 partie	
Sulfate de sodium pulvérisé. . .	8 parties	— 18°
Acide chlorhydrique.	5 parties	

Mélanges réfrigérants de neige et de sels à 0°.

Neige (ou glace pilée).	1 partie	— 18°
Sel marin.	1 partie	
Neige.	2 parties	— 51°
Chlorure de calcium crist. pulv.	3 parties	

O. — Alliages fusibles pour tests de stérilisation.

Bismuth.	8 parties	fusible à + 100°. Pression 1 kgr. (alliage de Darcet).
Plomb. .	5 parties	
Etain. .	3 parties	
Bismuth.	8 parties	fusible à + 113°3. Pression 1 kgr. 5.
Plomb. .	8 parties	
Etain, .	4 parties	
Bismuth.	8 parties	fusible à + 123°. Pression 2 kgr.
Plomb .	8 parties	
Etain .	3 parties	

On fond, dans une coupelle, d'abord le plomb sous une couche de charbon de bois en poudre, puis on ajoute le bismuth et l'étain. On mélange et on coule en disques ou en crayons dans un moule métallique.

On peut ainsi préparer des pastilles qu'on emploie comme tests de stérilisation. Incluses dans un tube à essai ou dans une boîte de Petri, on les place dans l'autoclave au milieu des objets qu'on veut porter sûrement, dans toute leur masse, à une température déterminée.

En mélangeant à chaud 9 parties d'alliage de Darcet et 1 partie de mercure, on obtient un amalgame fusible à 53°.

P. — Solubilité des principaux corps chimiques employés en microbiologie.

1° Composés minéraux.

	POIDS DU CORPS SOLUBLE EN GRAMMES : dans l'eau à 15°	dans l'alcool.
Alun d'ammoniaque crist.	10 gr.	insoluble
Carbonate d'ammonium. .	25	»
Nitrate d'argent. . . .	215	10
Acide arsénieux.	1,2	0,72
Acide arsénique.	16,7	très soluble
Acide borique crist. . .	3	25 bouillant.
Acide chromique. . . .	160	soluble
Carbonate de lithium. . .	0,77	insoluble
Carbonate de magnésium.	0,01	»
Phosphate de magnésium.	0,3	»
Sulfate de magnésium. .	33	»
Chlorure mercureux. . .	insoluble	»
Iodure mercureux. . . .	0,04	»
Chlorure mercurique. . .	7	33
Cyanure mercurique. . .	12	5

Iodure mercurique . .	0,6	0,8
Chlorure de potassium .	33	0,5
Bromure de potassium .	64,5	0,5
Carbonate de potassium anhydre	90	insoluble
Bicarbonate de potassium .	25	»
Iodure de potassium . .	140	1 5
Nitrate de potassium .	25	insoluble
Permanganate de potassium	6,3	décomposé 1,8
Arséniate de sodium . .	28	insoluble
Arsénite de sodium . .	très soluble.	»
Borate de sodium . . .	7	»
Carbonate de sodium crist.	88	»
Bicarbonate de sodium .	10,5	»
Chlorure de sodium . .	95	»
Nitrate de sodium . . .	82	»
Phosphate bibasique de sodium	15	»
Phosphate tribasique . .	20	»
Sulfate de sodium anhydre.	25	»
Sulfite de sodium . . .	25	»
Bisulfite de sodium . .	très soluble	»
Hyposulfite	60	»

2° Composés organiques.

a) *Série grasse.*

		SOLUBILITÉ DANS 100 P. D'EAU.	POINT D'ÉBULLITION.
Série méthyl.	Chloroforme.	traces	61,2
	Tétrachlorure de carbone.	insoluble	78,1
	Iodoforme.	»	vap.
	Triméthylamine. . . .	»	9,3
	Urée.	100	décomposé
Série éthyl.	Acide acétique.	très soluble	117,3
	Acide oxalique.	170	décomposé
	Alcool éthylique. . . .	très soluble	78,05
	Chloral (hydrate de). .	»	98 (déc.)
	Glycocolle.	23	décomposé
Série propyl.	Acétone.	très soluble	56,4
	Acroléine.	2,5	52
	Monochlorhydrine. . .	très soluble	227
	Dichlorhydrine. . . .	peu soluble	185
	Glycérine.	très soluble	290,4
Série butyl.	Acide butyrique. . . .	»	160
	Acide malique.	»	décomposé
	Acide succinique. . . .	5,2	235 (déc.)
	Acide tartrique. . . .	170	décomposé
	Asparagine.	1,8	»
	Succinimide.	soluble	287
Série amyl.	Furfurol.	9	162
Série hexyl.	Leucine.	3,7	décomposé
Séries supérieures.	Acide oléique.	insoluble	
	Acide palmitique. . . .	»	348
	Acide stéarique. . . .	»	287
	Paraffine.	»	300

b) *Série aromatique et divers.*

	SOLUBILITÉ DANS 100 P. D'ALCOOL.	POINT D'ÉBULLITION.
Benzine.	très soluble	80,5
Phénol.	»	183
Aniline.	t. sol. (3 % dans l'eau)	182
Hydroquinone.	très soluble	sublimée
Phloroglucine.	t. sol. (40 d'eau)	210
Toluène.	peu soluble	182
Xylol.	soluble	218
Acide tannique. . . .	t. sol. (40 d'eau)	décomposé
Acide gallique.	»	»
Napthaline.	peu soluble	218
Thymol.	t. sol. (0,3 eau)	230
Menthol.	(peu soluble eau)	212
Camphre.	soluble	209
Indol.	très soluble	245 déc.

c) *Sels d'acides organiques.*

	SOLUBILITÉ DANS 100 P. D'EAU.
Acétate d'ammonium.	très soluble
Acétate de plomb.	66
Acétate de potassium.	190
Acétate de sodium.	28
Benzoate de sodium.	très soluble
Citrate de sodium.	40
Lactate de zinc.	2
Oxalate d'ammonium.	33
Oxalate de potassium.	33
Tartrate de potassium.	150

d) *Sucres.*

En $C^5H^{10}O^5$	Arabinose.	soluble
En $C^6H^{14}O^6$	Mannite.	16
	Dulcite.	4
	Sorbite.	soluble

En $C^6H^{12}O^6$ Réduisant la liq. de Fehling :

Glucose.	81
Lévulose.	très soluble
Galactose.	»

En $C^{12}H^{22}O^{11}$

Saccharose.	300
Lactose.	20
Maltose.	très soluble

R. Table de dilutions de l'alcool.

(en partant de l'alcool à 90°)

TITRE ALCOOMÉTRIQUE.	VOLUME D'EAU A AJOUTER A 100 VOLUMES D'ALCOOL A 90°
80°	14 cc.
75°	22 cc.
70°	31 cc.
65°	42 cc.
60°	54 cc.
50°	85 cc.
40°	131 cc.
30°	206 cc.

CHAPITRE XIII

MATÉRIEL ET INSTRUMENTATION D'UN LABORATOIRE DE RECHERCHES MICROBIOLOGIQUES

Pour l'installation matérielle d'un laboratoire, on trouvera toutes les indications utiles, tant en ce qui concerne le mobilier proprement dit (tables de lave émaillée, éviers, cuvettes, meubles divers, etc.) qu'en ce qui se rapporte aux appareils d'optiques, à la verrerie et aux produits chimiques, dans les catalogues des principales maisons françaises, notamment les suivantes :

Jouan, 45, rue de la Quintinie, Paris, XV[e] (installations et fournitures d'appareils de laboratoires, étuves, autoclaves, balances de précision, etc.).

Flicotaux et *Boutet* (mobilier, tables de lave), 83, rue du Bac, Paris.

Poulenc frères (produits chimiques et appareils), 92, rue Vieille-du-Temple, Paris.

Leune (verrerie et appareils, 28 *bis*, rue du Cardinal, Lemoine.

Lequeux (étuves, autoclaves et appareils de laboratoire), 64, rue Gay-Lussac.

E. Cogit (appareils de laboratoire, verrerie, réactifs colorants et divers), 36, boulevard Saint-Michel.

Stiassnie (microscopes), 204, boulevard Raspail

Nachet (microscopes), 17, rue Saint-Séverin.

Société française des Instruments d'optique (microscopes), 50-52, rue de Saint-Quentin, *Le Havre* (Seine-Inférieure).

Nous donnons seulement ci-après la liste des objets (instruments, verrerie et produits chimiques, non compris le mobilier) qu'on peut considérer comme nécessaires au fonctionnement normal d'un laboratoire de recherches microbiologiques. Nous supposons que ce laboratoire est pourvu de gaz et d'eau sous pression. S'il en était autrement, il faudrait prévoir des appareils de chauffage au

pétrole, à l'alcool, à l'acétylène ou à l'électricité, et pour remplacer l'eau sous pression actionnant les trompes, une ou plusieurs pompes à vide telles que celle de Moulin (construite par Beaudoin, 31, rue Lhomond).

A. APPAREILS D'OPTIQUE

Microscope complet avec platine mobile, condensateur, diaphragme-iris, revolver à trois objectifs.

Oculaires compensateurs 2, 6, 12, 18, soit, distance focale en mm. 90, 30, 15 et 10.

Objectif apochromatique à immersion homogène 1/18 ou 2 mm. 1,30 ouvert, avec diaphragme à fond noir pour servir à l'ultramicroscope.

Objectifs apochromatiques à sec 2, 6 et 8 de Stiassnie.

Condensateur parabolique pour l'éclairage à fond noir (ultramicroscope).

Micromètre objectif.

Chambre claire (prisme à dessiner).

Hématimètre compte-globules de Malassez, construit par Stiassnie.

Lampe de Ranvier à bec Auer, lentille mobile ou tout autre dispositif analogue (électrique ou à gaz) pour l'éclairage du microscope (lampe Nernst ou lampe Graetzine avec cylindre de tôle) avec une boule condensatrice en verre et support.

Lampes électriques de 100 et 200 bougies (de projecteur d'automobiles) et réducteur de potentiel, ou transformateur, pour les adapter au courant distribué.

B. APPAREILS DE LABORATOIRE

Trompe métallique à vide, montée sur tablette, avec manomètre et réservoir pour éviter les retours d'eau.

Becs Bunsen avec robinet à gaz et veilleuse.

Becs de Garros avec rallumeur et support.

Four Pasteur horizontal (Jouan) pour flamber la verrerie.

Autoclave Chamberland, couvercle à charnière ; diam. min. 0,25 ou mieux 0,34.

Bain-marie rectangulaire à deux trous, à niveau constant, avec brûleur.

Entonnoir à filtrations chaudes avec double paroi de cuivre.

Soufflet d'Enfer (table d'émailleur) avec chalumeau à gaz.

Alambic en cuivre rouge pour distillation de l'eau (capacité utile 6 litres).

Etuve à température constante avec régulateur de Roux. Haut. min. 1 m., profondeur 0,40.

Pour les pays chauds : étuve avec réfrigérant.

Bain-marie pour stériliser le sérum, modèle de Roux 0 m. 22 × 0 m. 20.

Etuve de Gay-Lussac, avec support spécial pour tubes à sérum coagulé avec régulateur.

Table chauffante à étages, en cuivre nickelé, avec brûleur.

Filtre Chamberland (avec tonnelet en verre).

Filtre à toxines de L. Martin, grand modèle, avec ballons et bougies de rechange.

Fourneaux à gaz forme basse, à manche, sans robinet, de 0 m. 20 de diamètre.

Autoclave à vide horizontal, diam. 0,25 avec régulateur bimétallique et brûleur.

Vitrine à instruments pour être posée sur un meuble, en cuivre nickelé, panneaux et tablettes en glace (haut. 0 m. 78, larg. 0 m. 50, prof. 0 m. 35).

Supports universels en cuivre, sur table de fonte, avec brûleur cintré sur support à glissière.

Petit centrifugeur à main (2 tubes).

Petit centrifugeur électrique à 4 tubes de 20 mm. × 120 mm. pour courant continu ou alternatif (indiquer le voltage ou, à défaut d'élec-

tricité, centrifugeur hydraulique à 4 tubes.

Balance de Roberval 10 kil. avec poids.

Balance-trébuchet de précision sous cage, sensible à 5 milligr., force 100 gr., avec série de poids cuivre nickelé.

Grand microtome Minot, automatique, engrenage à 1/1000 avec rasoirs de rechange.

Appareil à contention de Debrand ou Malassez, complet, monté sur table en fer nickelé.

Appareil à contention de Latapie pour les animaux d'expériences.

Bain-marie à paraffine pour inclusions avec régulateur, chauffé au gaz

Dessiccateur avec étagère nickelée, dans une cloche à douille avec robinet de verre pour le vide ; manomètre.

Etuve à dessiccation à air chaud en tôle, chauffage à double paroi, 2 tablettes, avec régulateur.

Broyeur Latapie, petit modèle.

Bain-marie de Beauvy pour hémolyse, avec régulateur bi-métallique, thermomètre et brûleur.

Armoire-glacière « Frigorificus » (1) de 1 m³ de capacité.

Bocaux en verre pour souris, à couvercles grillagés, de 0 m. 15 × 0 m 20.

Cages à lapins et à cobayes, en fer galvanisé, à fond grillagé.

Cages à singes et à cobayes, en fer galvanisé, à fond grillagé.

Presse à jus de viande, vis à poignée, cuvette mobile émaillée (2 litres).

Hache-viande broyeur à disques interchangeables, avec un jeu de 6 disques (54 mm.) nickelé.

Balance pour peser les petits animaux jusqu'à 10 kilogr., série de poids en cuivre et fonte.

Supports en bois pour 6, 12, 24 tubes à essais.

Support en bois à plateau, à hauteur variable, pour pipettes.

Support en cuivre à trois anneaux pour entonnoirs, sur plateau en fonte.

Petite meule pour aiguiser les outils de laboratoire, à fixer sur une table.

Appareil à hydrogène ou à acide carbonique, modèle de l'Institut Pasteur, en boîte munie de poignées.

C. VERRERIE ET PETITS APPAREILS

Cristallisoirs à recouvrement de 150 × 220 en verre de Bohême ou de Krasna, incassable.

Verres de montre en verre de Krasna, de 25 mm., 40 mm. et 60 mm. de diamètre.

Bocaux en verre blanc, bouchés à l'émeri de 30, 250 cc. 1 à 2 litres.

Conserves cylindriques sans couvercle, forme haute de 1, 2 et 5 litres.

Flacons à large ouverture bouchés à l'émeri de 15, 30, 90, 125, 250, 500 cc. 1 et 2 litres.

Flacon à huile à immersion.

Flacon à baume de Canada avec couvercle rodé, tige de verre.

Flacons compte-gouttes, bouchons plats en verre blanc et jaune pour réactifs, de 50 et 100 cc.

Support en bois avec 6 conserves de Borrel pour colorations sur lames.

Boîtes de Pétri pour cultures, diamètres 60, 100 et 150 mm.

Boîtes rondes en verre, à couvercle rodé de 50 à 90 mm.

Boîtes plates de Roux pour cultures en larges surfaces.

Cristallisoirs de dimensions variables, diam. 0 m. 05, 0 m. 08, 0 m 11, 0 m. 14, 0 m. 16, 0 m. 19, 0 m. 26, 0 m. 29.

Disques en verre de divers diamètres pour couvrir les capsules et les vases.

Capsules à bec en porcelaine de Bayeux et en verre, diamètres variables de 0,025 à 0.125 mm

Flacons tubulés au bas, de 1 litre (pour les moelles rabiques).

Barils en verre, à robinets de verre pour antiseptiques.

Cloche à microscope en verre jaune à bouton taillé.

Cuvettes à photographie, horizon-

(1) Chez Geneste-Herscher, 42, rue du Chemin-Vert, Paris.

tales, en porcelaine et en verre uni, de dimensions variables, longues et rectangulaires.

Dialyseurs en verre de Graham, montés sur cristallisoirs, de 120, 180 et 250 mm.

Fioles à fond plat jaugées à un trait, bouchées à l'émeri, de 50, 100, 250, 500 cc. et 1 litre.

Pipettes jaugées à deux traits de 5, 10, 50 et 100 cc.

Pipettes graduées à 1/10 cc , de 1 cc.

Pipettes graduées à 1/10 cc., de 10 cc.

Eprouvettes à pied et bec, graduées par cc. de 5, 10, 50, 100, 250 cc.

Eprouvettes de 500 cc., graduées par 5 cc.

Eprouvettes de 1 litre, graduées par 10 cc.

Thermomètres à mercure en verre recuit de — 5 + 60, par degré.
de — 5 + 105, par degré.

Thermomètres étalons à échelle fractionnée par 1/10e de degré, en verre recuit :

de — 5 + 25 degrés.
de + 25 à + 50
de + 50 à + 75
de + 75 à + 102
de + 98 à + 125

Thermomètres pour cobaves et lapins, gradués de + 28 à + 44°, par 1/10, à maxima.

Thermomètres médicaux maxima à pression.

Entonnoirs à angle de 60°, de divers diamètres.

Ballons à long col, dits matras à sceller, de 250, 500 cc. et 1 litre.

Ballons à bouillon, à fond plat, en verre vert, col coupé droit sans bague ni bec, de 250, 500, 750 cc., 1 et 2 litres.

Flacons en verre mince, stérilisables à l'autoclave, pour toxines. Capacité 125, 250, 500 cc. et 1 litre.

Vases-conserves de 1 litre et 2 litres, stérilisables à l'autoclave, en verre vert, pour recueillir le sang des saignées.

Fioles coniques à tubulure latérale pour filtrer à la trompe, de 250 cc., 500 cc. et 1 litre.

Mortiers en porcelaine et en verre avec pilons, forme basse, de 250, 500 cc. et 1 litre.

Verres à expériences, à pied et à bec de 30, 60, 125, 500 gr., 1 et 2 litres.

Eprouvettes à pied à bec, non graduées, de 1 à 2 litres.

Eprouvettes à pied bouchées à l'émeri de 250, 500 cc. et 1 litre.

Eprouvettes à cuvette supérieure de 1 litre (pour filtrer les toxines).

Flacons à tare (pour trébuchet) bouchés à l'émeri, de 15 et 25 cc.

Grenaille de plomb pour flacons à tare.

Mortier d'agate avec pilon de 100 mm. de diamètre.

Crayons bleus pour écrire sur le verre.

Couteaux à couper le verre.

Bougies Chamberland avec et sans embase, marques F et L.

Pissettes à eau froide pour lavages, de 1 litre.

Tubes en verre de 1 m. de longueur pour effiler et fabriquer des pipettes. Diam. ext. 8, 10, 12, 16 mm. (au kilogr.).

Baguettes en verre plein pour agitateurs, diamètres 5, 6, 7, 8 et 10 mm. (au kilogr.)

Perles en verre pour défibriner le sang (au kilogr.).

Flacons laveurs, sans tubes de sûreté.

Robinets de verre, dits de communication. à deux et à trois voies horizontales

Tubes à essai pour cultures par centaines). diam. :

0,012 × 0,12.
0,016 × 0,16.
0,022 × 0,22.

Tubes pour cultures sur pommes de terre, étranglés de 0,022 × 0,22.

Tubes courts à fond plat (pour les insectes) bouchés au liège de 5, 8, 10, 12 et 14 mm. de diam.

Capuchons de caoutchouc pour tubes de culture de 12, 16, 20 mm., feuille anglaise rouge.

Ballons à filtrer avec petites bougies Chamberland montées au moyen d'une bague en caoutchouc ; entonnoir en verre soufflé entrant dans la bougie. Bagues et bougies de rechange (marque F).

Fioles coniques d'Erlenmeyer en verre mince, de 50, 75, 100, 250, 500 gr., 1 et 2 litres.

Fioles d'Erlenmeyer en verre de Bohême ou en verre incassable de Krasna, de 90 cc., 125, 250 et 500 cc.

Petites bougies Chamberland sans embase marque L^1 à L^{11}.

Trousse alcoométrique à trois alcoomètres de 0 à 35, de 35 à 70, de 70 à 100°.

Compte-gouttes de Duclaux.

Densimètre universel pour liquides plus lourds et plus légers que l'eau.

Fils et petites spatules de platine emmanchés sur ébonite (de Binot), épaisseur 4/50, 6/10 et 8/10 (chez Stiassnie).

Emporte pièce pour découper les pommes de terre.

Casseroles à couvercle et à manche, fond plat en tôle émaillée de 2 à 4 litres.

Marmites en tôle émaillée avec poignée et couvercle de 2 et 4 litres.

Cuillère à manche, en tôle émaillée, pour décanter les bouillons.

Vases semi-coniques en tôle émaillée, avec couvercle et anse fond plat, pour les bouillons, de 1 litre 1/2 et 3 litres.

Pince à mors plats, fenêtres courtes et longues, pour saisir les petits animaux.

Scalpels à manche de métal, petits, moyens et grands.

Aiguilles à dissocier, manche de métal, droites et en fer de lance

Aiguilles de Reverdin pour sutures, droites et courbes.

Pinces et agrafes de Michel pour sutures.

Sondes cannelées en acier nickelé de 0,12.

Lancettes à manche métallique de Chambon.

Curettes tranchantes, manche métallique.

Trocarts à saignée, de Roux et Nocard.

Lames porte-objets, demi-glace blanche, bords rodés et polis de 0,076 × 0 026 (par cent).

Lames de 76 × 26, épaisseur calibrée pour ultramicroscopie (par cent)

Lamelles couvre-objets en verre mince, de 13/100 de mm. carrés, de 14 mm. et de 22 mm. (par cent)

Anneaux de verre rodés des deux côtés, pour chambres humides.

Moules en cuivre nickelé pour couler la paraffine et monter les pièces à inclure, grand modèle.

Crochet en cuivre nickelé à manche, pour luter à la paraffine.

Spatules en maillechort, montées sur manche d'ébène, de 0 020 de largeur.

Pierre d'Arkansas de 125 mm. de longueur pour aiguiser les instruments.

Cuir à rasoirs à 4 faces de Zimmer en étui.

Ciseaux à dissection, pointus, droits et courbes à tenon.

Ciseaux à autopsie, droits et courbes à tenon.

Pinces à dissection, nickelées

Pinces droites et courbées, pointues, pour dissections fines.

Pinces hémostatiques de Péan

Pinces à artères, droites et courbes.

Petits trocarts adaptables aux seringues de Roux-Collin pour petits animaux.

Seringues stérilisables de Roux-Collin à pistons de caoutchouc, de 1, 2, 5, 10 et 20 cc. Pistons et tubes de rechange.

Aiguilles d'acier de divers calibres pour ces seringues.

Pince à fixer la tête des lapins.

Cisaille courbe pour couper les vertèbres.

Trépan à lapins avec couronne de rechange.

Crochet pour rondelles d'os.

Blépharostat écarteur.

Pince universelle, plate et coupante.

Plaques de liège pour dissection (260 × 190 et 270 × 180 × 4 mm).

Pulvérisateur de Richardson avec plusieurs poires en caoutchouc de rechange

Tubes en caoutchouc, feuille anglaise rouge, de 2, 4, 6, 8, 10 et 12 mm. (par kilogr.).

Tubes de caoutchouc à vide avec 3 toiles interposées, diamètres intérieurs 10, 14 et 18 mm. (par mètre).

Valets en paille de 60 à 100 mm. de diamètre intérieur.

Bouchons en caoutchouc para rouge, pleins, nos 1 à 16 (par unité).

A 1 trou, nos 2 à 15 ;
A 2 trous, nos 3 à 16 ;
A 3 trous, nos 3 à 16.

Bouchons de liège, coniques, de dimensions assorties (par cent).

Amiante en mèches demi-longues.

Amiante cardée pour filtrer.

Toile d'amiante pour filtrer.

Boîte en cuivre nickelé, rectangulaire, pour stériliser les instruments par ébullition, long. 20 cent., larg. 12 à 14, haut. 12 cent avec grille intérieure mobile et couvercle.

Plateaux à contention rectangulaire percés de trous tout autour, pour fixer les animaux, en cuivre rouge brasé, de 0,65 × 0,32 et de 0,50 × 0,25.

Plateau en chêne pour fixer les lapins à trépaner (percé de trous).

Paniers en carton percés de trous forme cylindrique, pour tubes de culture.

Paniers en toile métallique galvanisée, pour porter les tubes de culture à l'autoclave.

Paniers en fer-blanc avec couvercle à poignée, anse, fond en toile métallique, pour la stérilisation à l autoclave (suivant diamètre intérieur de l'autoclave .

Spatules en acier flexibles, de 75 à 100 et 150 mm.

Papier à filtrer blanc (par rames).

Papier à filtrer gris (par rames).

Papier Chardin pour filtrer la gélose (par liasses)

Papier à filtrer plissé de Laurent, renforcé (diam. 15, 19, 25, 33, 40 et 50 cm) par cent.

Perce-bouchons en cuivre, série de 6 grosseurs.

Pinces en bois pour capsules.

Pinces en bois pour matras.

Pinces à ressort de Mohr.

D. — PRODUITS CHIMIQUES

	UNITÉS.
Acétate d'ammoniaque pur crist.	hgr.
Acétate d'aniline. . . .	»
» d'argent crist. . .	»
» de baryte pur crist.	»
» de chaux pur crist.	»
» neutre de cuivre pur crist. . . .	»
Acétate de cuivre ammoniacal	hgr.
» neutre de plomb pur.	»
» tribasique de plomb crist. . .	»
» de potassium pur sec	
» de sodium pur crist.	»
» d'urane chim. pur.	»
» de zinc chim. pur.	»
Acétone pure	kgr.
Acide acétique crist. . .	»
» azotique pur à 40° B.	»
» borique crist . . .	»
» chlorhydrique pur. .	»
» chlorhydrique ord.	par tourie.
» chromique pur crist.	hgr.
» citrique chim. pur crist.	gr.
» gallique crist. . . .	»
» formique pur crist. 25° B.	»
» lactique pur. . . .	»
» nitrique pur 45° B. .	kgr.
» nitrique ord. .	par tourie.
» osmique par tubes de 1 gr.	gr.
» oxalique pur. . . .	hgr.
» phénique pur neigeux.	»
» picrique pur. . .	»
» phosphorique ortho pur crist. . .	»
» phosphorique anhydre.	»
» pyrogallique. . . .	»
» salicylique pur crist.	»
» sulfurique pur 66° .	kgr.
» sulfurique ord. 66°.	par tourie.
» sulfanilique. . . .	gr.
» sulfoindigotique pur.	»
» succinique pur. . .	hgr.
» tartrique crist. pur.	»
» thymique (thymol) .	»
Agar-agar (gélose) . . .	kgr.
Albumine d'œuf ord. . .	hgr.
Alcool absolu.	litre.
» rectifié 96°. . . .	»
» amylique pur. . .	»
» méthylique pur. .	»
Aldéhyde formique (formol).	»
Alun de potasse ord. . .	kgr.
» d'ammoniaque pur.	hgr.

	UNITÉS.
Aniline pure, huile d'aniline	hgr.
Arséniate de soude pur	»
» de potasse pur	»
Alun de fer pur crist.	»
Amidon pulvérisé	»
Ammoniaque pure 28° B.	»
» ord. 22° B.	tourie.
Arsénite de soude	hgr.
Asparagine	gr.
Azotate d'ammoniaque pur	hgr.
» d'argent crist pur.	»
» de bismuth (sous).	»
» de cuivre ammoniacal	»
» de potasse pur	»
» de soude pur	kgr.
» de zinc pur	hgr.
Azotite de potasse pur	»
» de soude pur	»
Baryte caustique pure	»
» hydratée crist.	kgr.
Benzine pure	litre.
» ord. rectifié 0 850	»
Bitume de Judée	hgr.
Blanc de Meudon	kgr.
Bichromate de potasse pur.	»
Bois de Panama	»
Borate de soude pur	»
Brome pur	hgr.
Bromure de potassium	»
» de sodium pur.	»
Bromhydrate de quinine.	gr.
Brucine pure	»
Caféine	»
Camphre raffiné	kgr.
Caoutchouc en dissolution.	»
Carbonate d'ammoniaque pur crist.	hgr.
Carbonate de chaux précipité pur	kgr.
Carbonate de lithine	hgr.
» de magnésie chim. pur.	»
Carbonate de plomb chim. pur	kgr.
Carbonate de potasse neutre pur	»
Bicarbonate de potasse chim. pur	»
Carbonate de soude neutre pur	»
Bicarbonate de soude pur.	»
Carbonate de zinc pur	hgr.
Carmin ammoniacal	gr.
Caséine pure	»

	UNITÉS.
Cellulose d'alfa pour filtration	kgr.
Charbon animal pulvérisé pur	hgr.
Charbon animal lavé en grains	kgr.
Charbon de Berzelius en bâtons pour couper le verre	pièce.
Chaux chim. pure	hgr.
Chaux du marbre exempte de Cl	kgr.
Chloral hydraté crist.	hgr.
Chlorate de potasse pur crist.	»
Chlorhydrate de cocaïne.	gr.
» de morphine.	»
» de quinine	»
» de strychnine	»
Monochlorhydrine de la glycérine	hgr.
Chloroforme anesthésique pur	kgr.
Chlorure de calcium pur desséché	»
Tétrachlorure de carbone	hgr.
Chlorure de chaux sec.	kgr.
» de cuivre ammon.	hgr.
» ferrique hydraté desséché	»
» de magnésium pur sec	»
» mercureux crist. (calomel)	»
» (Bi) mercurique ord. crist.	kgr
» de méthyle purifié	tubes.
» d'or pur et neutre	gr.
» (Tetra) de platine	»
» de potassium pur	kgr.
Chlorure de zinc liquide.	kgr.
Trichlorure d'iode	hgr.
Cholestérine	gr.
Chromate de potasse pur crist.	hgr.
Cire blanche animale.	kgr.
Cire Golaz (mastic de laboratoire)	bâtons.
Citrate de soude pur	hgr.
» de magnésie	»
Collodion normal (non riciné)	litre.

	UNITÉS.
Coton azotique pour collodion	hgr.
Coton cardé extra	kgr.
» hydrophile.	»
» de verre (pour filtration).	hgr.
Craie lavée.	kgr.
» en bâtons blanche.	boîte.
» couleur.	»
Crème de tartre (bitartrate de potasse) pure	hgr.
Crème de tartre en paillettes	»
Créosote de hêtre.	»
Crésylol (crésol)	kgr.
Cuivre en fil	»
» en limaille	»
Curare	gr.
Cyanure de potassium pur.	hgr.
» de mercure.	»
Dextrine pure précipitée.	kgr.
Diamidoazobenzol (phénylènediamine).	gr.
Diastase pure (maltase).	»
Diamidophénol (chlorhydrate).	hgr.
Diphénylamine pure crist.	»
Eau oxygénée à 12 vol.	kgr.
» de Javel concentrée.	»
Emeri en poudre nos fins.	hgr.
Emétique (tartrate d'antimoine et de potasse).	»
Encre à écrire sur le verre.	flacons.
Essence de cajeput verte.	hgr.
» de cèdre.	»
» de girofle.	
» de térébenthine pure.	kgr.
Ether sulfurique à 65° B.	litre.
Fécule de pommes de terre.	kgr.
Ferricyanure de potassium pur.	hgr.
Ferrocyanure de potassium pur.	»
Fluorure de sodium pur.	»
Furfurol pur.	gr.
Gaïacol pur crist.	hgr.
Gaïac (résine) en morceaux.	»
Gélatine PW extra blanche (ou Coignet).	kgr.
Glu marine.	hgr.
Glucose anhydre chim. pur.	kgr.
Glucose anhydre purifié.	kgr.
Gluten-caséine.	gr.
Glycérine à 30° B.	kgr.
Glycérine ord. à 28° B.	»

	UNITÉS.
Glycocolle	gr.
Gomme arabique en morceaux, véritable	hgr.
Gomme copal ordinaire.	»
Gomme laque blonde.	»
Goudron de Norvège.	kgr.
Hématéine chim. pure du campêche.	gr.
Huile de pieds de bœuf.	kgr.
Huile d'amandes douces vraie	kgr.
Huile de cèdre à immersion	flacons.
Huile de lin.	kgr.
» de paraffine.	»
» de vaseline.	»
Hydroquinone sublimée.	gr.
Hydroquinone photogr. ord.	hgr.
Hydrosulfite de soude liquide.	»
Hypobromite de soude.	»
Hypochlorite de chaux pur.	kgr.
Hypochlorite de chaux ord.	»
Hypochlorite de soude pur liquide	»
Hypophosphite de soude.	hgr.
Hyposulfite de soude pur.	»
» de soude phot.	kgr.
Indigotine pure sublimée.	gr.
Inuline de Dragendorff.	»
Iode bisublimé.	hgr.
Iodoforme crist.	»
Iodure mercurique crist.	»
» de potassium pur.	»
» de sodium crist.	»
» de zinc pur	»
Chloro iodure de zinc.	»
Kaolin lavé.	kgr.
Lactate d'ammoniaque pur	hgr.
» de chaux.	»
» de zinc.	»
Lactose (sucre de lait).	»
Lessive de potasse pure 45° B.	kgr.
Lessive de soude pure 45 B.	»
Lévulose crist.	hgr.
Litharge en paillettes.	kgr.
Lycopode	hgr.
Magnésie calcinée anhydre.	»
Magnésium en poudre.	»
Malto-peptone.	kgr.
Maltose purifié.	hgr.
Manganate de soude.	»

	UNITÉS.
Mannite pure	hgr.
Marbre blanc concassé. .	kgr.
Menthol pur.	hgr.
Mercure (par potiche de 34 k. 500).	kgr.
Métaphénylène diamine pure.	gr.
Méthylamine (tri) pure anhydre	»
Methyl-orange (Hélianthine)	»
Minium pur	hgr.
Monobutyrine.	gr.
Naphtylamine B. . . .	»
Naphtaline en boules . .	kgr.
Naphtoquinone B. . . .	gr.
Nitroprussiate de sodium.	»
Nutrose (caséine sodique).	hgr.
Nucléine pure.	gr.
Oléine pure.	hgr.
Racine d'orcanette pulv.	»
Orcéine de l'orseille. . .	gr.
Oxalate d'ammoniaque neutre pur.	hgr.
Oxalate de chaux pur. .	»
Oxalate de potassium pur neutre.	»
Oxalate de sodium neutre pur.	»
Oxychlorure de zinc. . .	»
Oxyde de manganèse pur (bi).	»
Oxyde mercurique (bi). .	»
» mercureux (proto).	»
» de zinc pur. . .	»
Pancréatine absolue pure.	gr.
Papaïne.	»
Papier dialyseur	feuille.
» de soie (Joseph). .	rame.
» Papier émeri (nos variés)	feuille.
Paraffine molle 47/38 . .	kgr.
» molle 40/42. . .	»
Paraformaldéhyde (trioxyméthylène).	»
Parchemin animal . . .	kgr.
Pepsine pure granulée titre 50	hgr.
Peptone sèche spongieuse.	kgr.
» de Chapoteaut. fl.	ou kgr.
» Chassaing . . .	hgr.
Permanganate de chaux crist.	»
Permanganate de potasse pur.	»
Peroxyde de sodium. . .	»
Persulfate d'ammoniaque.	»

	UNITÉS.
Persulfate de soude. . .	hgr.
Phloroglucine.	gr.
Phosphate d'ammoniaque neutre pur bibasique. .	hgr.
Phosphate de chaux neutre bibasique	hgr.
Phosphate tribasique de chaux pur	kgr.
Phosphate neutre de potasse (bibasique) . . .	hgr.
Phosphate neutre de soude (bibasique)	»
Hypophosphite de soude.	»
Phénylhydrazine. . . .	gr.
Phloroglucine	»
Phtaléine du phénol. . .	hgr.
Picrocarminate d'ammoniaque sec pur. . . .	gr.
Plâtre à modeler. . . .	kgr.
Potasse caustique à l'alcool.	»
Potasse caustique en pastille.	»
Présure liquide.	flacon.
Pyridine.	hgr.
Résine de gaïac . . .	»
Ricine.	gr.
Résine Dammar. . . .	kgr.
Sable fin de Fontainebleau.	»
Saccharose.	kgr.
Salicylate de soude crist.	hgr.
Savon amygdalin. . . .	kgr.
Sel de Seignette (tartrate de potasse et de soude). .	hgr.
Silicate de potasse pur soluble.	»
Silicate de potasse 36° B.	kgr.
Silicate de soude pur soluble	hgr.
Silicate de soude liquide 45° B.	kgr.
Soude caustique à l'alcool	»
Soude caustique en pastilles	»
Soufre en canons . . .	»
Soufre en fleur, lavé. . .	kgr.
Stéarine pure.	gr.
Strychnine cristallisée. .	»
Succinate d'ammoniaque crist.	hgr.
Succinimide.	gr.
Sucre candi blanc. . .	kgr.
Sulfate d'alumine pur. .	»
Sulfate neutre d'ammoniaque pur.	»
Sulfate de baryte précipité pur.	

	UNITÉS.
Sulfate de chaux précipité pur.	hgr.
Sulfate de cuivre chim. pur.	kgr.
Sulfate de cuivre ord. .	»
Sulfate de cuivre ammoniacal.	»
Sulfate ferrique pur. . .	»
Sulfate ferreux pur. . .	»
Sulfate ferreux ord. . .	»
Sulfate de magnésie neutre pur.	»
Sulfate de magnésie pur.	»
Sulfate mercurique. . .	hgr.
Sulfate de morphine. . .	gr.
Sulfate acide de potasse (bi).	kgr.
Persulfate de potassium. .	hgr.
Sulfate neutre de quinine.	gr.
Sulfate acide de soude pur crist.	kgr.
Sulfate neutre de soude pur.	»
Sulfate de zinc pur. . .	hgr.
Sulfhydrate d'ammoniaque pur.	»
Sulfhydrate de soude du commerce (sulfure). .	kgr.
Bisulfite de chaux saturé.	»
Bisulfite de potasse neutre pur.	hgr.
Bisulfite de soude pur liq.	kgr.
Sulfocyanure de potassium pur.	hgr.
Sulfo-indigotate de soude.	»
Sulfure jaune d'arsenic (Orpiment)	kgr.
Sulfure de carbone pur.	»
Polysulfure de sodium. .	»
Sulfure de zinc précipité pur	»
Talc pulvérisé.	»
Tanin à l'éther extra. .	»
Tartrate acide d'ammoniaque.	hgr.
Tartrate acide de potasse (bi).	hgr.
Tartrate acide de soude (bi).	»
Taurocholate de soude. .	gr.
Teinture de tournesol bleue pure (de Kahlbaum). .	kgr.
Tétrachlorure de carbone.	»
Thymol crist.	»
Toluidine pure (ortho). .	hgr.
Toluène pur.	kgr.
Touraillons secs de brasserie.	»

	UNITÉS.
Tournesol pur soluble. .	hgr.
Tricrésol.	kgr.
Triméthylamine anhydre.	gr.
Trypsine pancréatique. .	»
Tyrosine.	»
Urée.	hgr.
Urotropine.	gr.
Vanilline	»
Vaseline blanche. . . .	kgr.
Xylène pur (xylol). . .	»
Zinc en poudre.	hgr.
Papiers réactifs à l'acétate de plomb.	cahier.
Papiers réactifs tournesol rouge.	»
Papiers réactifs tournesol bleu.	»
Papiers réactifs tournesol neutre.	»
Antiformine.	litre.
Nutrose de Heyden. . .	hgr.
Bleu de méthylène médicinal.	gr.

E. — **PRODUITS COLORANTS**

Bleu de méthylène purifié marque *R A L*. . . .	gr.
Bleu Crésyl brillant. . .	»
Bleu de toluidine. . . .	»
Chinablau (Bleu de Chine).	»
Brun vésuvine.	»
Carmin aluné sec. . . .	»
Chlorhydrate d'aniline (en paillettes).	hgr.
Chrysoïdine.	gr.
Eosine extra.	»
Fuchsine (Magenta). . .	hgr.
» acide ou Rubine S.	gr.
Encre de Burri (Pelikantusche) marque. *R A L*.	flacon.
Mélange panchrome de Pappenheim.	»
Orange G.	gr.
Orcéine acide (Unna). .	»
Picrocarmin lithiné sec. .	»
Pyronine	»
Ponceau P. R.	gr.
Rouge Congo.	»
Rouge neutre extra pur. .	hgr.
Safranine pure.	gr.
Soudan III.	»
Thionine pure (violet de Lauth).	hgr.
Tropéoline 00.	gr.
Trypanrot.	hgr.
Vert d'iode.	»

Vert lumière (Lichtgrün).	hgr.
Vert malachite pur crist. (Chlorzinkdoppelsalz chim. pur de Höchst)	»
Vert de méthyle crist. 00.	»
Violet dahlia.	»
» de gentiane. . . .	»
» de méthyle 6 B. .	gr.
Krystall-violet.	hgr.
Triacide d'Ehrlich (Grübler).	flacon.
Bleu polychrome de Unna	flacon
Colorant de Giemsa, glycériné *R A L*.	»
Baume de Canada au xylol.	tubes.
Paradiméthylaminobenzaldéhyde (pour diazo-réactions). . . .	hgr.
Hématoxyline de Heidenhain	»

DEUXIÈME PARTIE

EXPÉRIMENTATION SUR LES ANIMAUX

CHAPITRE XIV

ÉLEVAGE DES PETITS ANIMAUX DE LABORATOIRE

A. — **Lapins et cobayes.**

Le local destiné à l'élevage des lapins et des cobayes doit être pourvu d'eau, convenablement éclairé et facilement aérable. Les fenêtres seront largement ouvertes en été. Mais, en hiver, il convient de chauffer pendant les journées froides pour entretenir une température moyenne de 10 à 12°.

On répartira les animaux dans de petits box en ciment armé, de 1 m. 20 à 1 m. 50 de long, sur 0 m. 60 à 0 m. 80 de profondeur et 0 m. 60 de haut, reposant sur un sol cimenté, légèrement incliné vers une rigole extérieure. A la rigueur, de simples caisses de bois, munies d'un fond percé de trous et posées sur des supports de 1 m. à 1 m. 20 de haut, peuvent convenir. Box et caisses doivent être fermés par des cadres de bois grillagés, assez lourds pour qu'ils ne puissent être soulevés, surtout par les lapins. On les garnira toujours d'une abondante litière de paille.

La meilleure disposition consiste à placer les cages en une seule file le long des murs, et en double file sur la ligne médiane. On ménage ainsi deux allées latérales assez larges pour permettre le nettoyage et l'enlèvement des fumiers.

Lapins et cobayes reçoivent les mêmes aliments : en été fourrage vert (luzerne, trèfle, sainfoin), des feuilles de choux, des épluchures de salade, des fanes de carottes ou de navet, des grains (avoine de préférence au son, dont les proprié-

tés nutritives sont maintenant à peu près nulles). En hiver, les aliments seront remplacés par des betteraves, ou mieux par des carottes fourragères, du foin sec, des grains ou des restes de pain. Il est inutile de faire boire les animaux quand on les alimente avec des fourrages verts. On ne leur donnera un peu d'eau que dans le cas de régime sec.

Pour éviter la souillure et la perte des aliments, le fourrage sera placé dans un petit ratelier en fil de fer galvanisé, suspendu par deux clous à l'une des parois de la cage. Une mangeoire métallique, accrochée à la paroi opposée, recevra les grains.

Un lapin consomme chaque jour 600 à 800 grammes d'aliments verts et 200 à 250 grammes de betteraves ou de carottes ; un cobaye 200 à 300 grammes de fourrage vert ou 70 à 80 grammes de betteraves remplaçables par 40 à 50 grammes de carottes. Ces aliments sont distribués en deux repas, le premier le matin, immédiatement après le nettoyage des cages, le second le soir.

L'entretien des animaux comporte l'enlèvement quotidien des litières souillées, le raclage des box ou des cages et le lavage à grande eau du sol.

Les lapines destinées à la reproduction doivent être isolées. Dès l'âge de 6 à 9 mois elles sont aptes à reproduire. Au moment du rut on les transporte dans la cage d'un mâle où on les laisse une heure ou deux.

Une bonne lapine peut donner 4 à 5 portées par an. La durée de la gestation est en moyenne de 35 jours. Vers la fin, quand les femelles commencent à s'arracher les poils du ventre pour en faire un nid, il faut augmenter les aliments et donner un peu d'eau dans un abreuvoir métallique. Le nombre des petits est ordinairement de 5 ou 6, parfois, il s'élève jusqu'à dix. Du 20e au 25e jour, les jeunes lapereaux sortent du nid et commencent à brouter. Ils peuvent être sevrés à 6 semaines et séparés de leur mère. Celle-ci entre de nouveau en chaleur deux mois et demi après la mise bas et peut, dès lors, être représentée au mâle.

On ne conserve, pour la reproduction, que les lapines âgées de moins de deux ans, le nombre des portées annuelles et des petits diminuant par la suite. Un mâle suffit pour 8 ou 10 femelles.

Dès qu'on reconnaît qu'elles sont pleines, on sépare les

cobayes femelles des mâles et on les réunit par groupes de 5 ou 6 dans une même cage. Elles donnent 2 ou 3 petits, rarement 4, et la période de gestation dure 60 à 65 jours. Les cobayes naissent couverts de poils, marchent et s'essaient à manger dès leur naissance.

Lorsqu'elles ont atteint le 4e mois, les femelles peuvent être fécondées. Elles produisent 3 à 4 portées par an pendant 2 ans. Passé ce temps, elles ne conviennent plus à la reproduction.

On conservera un mâle pour une vingtaine de femelles.

Les animaux inoculés doivent être entretenus dans un local distinct du local d'élevage et aussi éloigné que possible de celui-ci. On les répartira, suivant les nécessités du travail, par groupes de 5 à 6 dans des cages métalliques grillagées, munies d'un plateau mobile ou, de préférence, dans des cages en ciment armé, parfaitement étanches, fermées latéralement par une porte métallique basculant sur deux axes. Ces cages seront ouvertes à 1 mètre environ du sol pour faciliter le nettoyage. Un trou, creusé au centre de leur paroi inférieure inclinée, facilitera l'écoulement des urines vers un tuyau qui débouchera dans un conduit étanche commun.

Immédiatement après l'inoculation, lapins et cobayes seront marqués à l'oreille au moyen d'une petite médaille métallique chiffrée, ou avec des couleurs variées dissoutes dans l'eau phéniquée à 5 p 1.000 et additionnées d'une petite quantité d'albumine pour assurer leur adhésion. Toutes les cages portent un numéro et une plaque à glissière sur laquelle on fixe un carton indiquant la date des inoculations, le nombre et la marque des animaux inoculés, etc.

B. — Rats et souris.

Ces animaux, dont la variété albinos est la plus recherchée, sont très faciles à élever dans des caisses de bois doublées de métal et fermées par un couvercle grillagé, ou dans des bocaux de verre. Dans les caisses, séparées par une cloison mobile, on dispose de petites boîtes-abris percées d'un trou, dans lesquelles les rongeurs peuvent se réfugier et élever leurs petits.

Le foin, la paille, la sciure de bois, du papier coupé en morceaux, constituent d'excellentes litières, mais la laine, les étoffes, le coton, les chiffons ne conviennent pas (Mouquet).

Rats et souris mangent beaucoup. 30 à 40 grammes d'aliments par jour sont nécessaires pour entretenir un rat ; 10 à 12 pour une souris : débris de pain, viande, grains (sauf l'orge) pour les rats, épluchures de légumes ou de fruits. Un régime composé uniquement d'avoine provoque un dépérissement rapide par carence ; un peu de verdure est indispensable comme rafraîchissant.

On ne manquera pas de mettre constamment à la disposition des petits rongeurs de l'eau dans une soucoupe, ou mieux dans un tube de verre percé à son extrémité inférieure d'une ouverture très étroite, bouché avec un bouchon de caoutchouc et suspendu à une des parois de la cage (Ponselle).

La gestation dure 21 jours chez les rats et les souris qui peuvent reproduire vers l'âge de 2 à 3 mois. On peut obtenir chaque année 5 ou 6 portées de 5 à 8 petits. Ceux-ci sont nus à leur naissance ; leurs yeux restent clos jusqu'au 13ᵉ jour. Ils sortent du nid du 15ᵉ au 20ᵉ jour et peuvent être sevrés le 20ᵉ jour pour les rats, le 30ᵉ pour les souris. Les femelles pleines doivent être séparées des mâles dont un seul suffit pour 8 à 10 reproductrices.

C. — Maladies des lapins.

Pasteurellose (maladie du nez). — Très contagieuse. Elle se traduit par de l'inappétence, de la prostration, du jetage, parfois de la toux et de la diarrhée. La mort survient rapidement.

Pneumococcie. — Rare chez les lapins neufs, cette affection est fréquente chez les animaux inoculés. Le pseudo-pneumocoque qui en est la cause est un microbe de sortie (M. Nicolle).

Nécrobacillose. — Due au bacille de la nécrose, ou bacille de Schmorl. Se traduit par de la dermite, des abcès sous-cutanés et pulmonaires, du coryza et des collections des sinus.

Pseudo-tuberculose. — Relativement rare chez le lapin,

elle est causée par le cocco-bacille de Malassez et Vignal. Son évolution est lente. A l'autopsie on trouve des lésions nodulaires du foie, de la rate et des intestins.

Coccidiose. — Elle revêt la forme intestinale ou la forme hépatique et se traduit par un amaigrissement progressif, l'aspect terne des poils, l'enflure du ventre, de la diarrhée et des convulsions. La mort survient en quelques jours chez les jeunes, en quelques semaines chez les adultes. A l'autopsie on trouve, dans le cas de coccidiose hépatique, des masses blanchâtres ou jaunâtres, échelonnées le long des canaux biliaires. Ces masses contiennent une énorme quantité d'oocystes ovalaires à double paroi, très réfringents. Dans la coccidiose intestinale, des plaques blanchâtres sont disséminées sur l'intestin grêle.

La diffusion de ces maladies très contagieuses sera évitée en surveillant attentivement les lapins et en séparant immédiatement ceux qui paraissent tristes ou ne mangent pas. Les cages infectées seront évacuées, puis abondamment lavées avec une solution crésylée forte. On répartira les animaux contaminés par petits lots dans des cages spéciales et on incinérera les cadavres ou on les enfouira profondément en les saupoudrant de chaux vive.

D'autres affections parasitaires dues à des strongles, des tœnias ou des cénures, peuvent également survenir. La cénurose, provoquée par la forme cystique du tœnia serialis du chien, se manifeste par des kystes plus ou moins volumineux au cou, à l'épaule ou sur la nuque et dans les séreuses.

Gale des oreilles. — La gale psoroptique des oreilles, due à Psoroptes communis, débute par le conduit auditif externe et envahit parfois l'oreille moyenne, déterminant des troubles de l'attitude, des accidents épileptiformes et la mort. Cette affection se traduit localement par des croûtes épaisses et adhérentes, obstruant le conduit auditif. Elle doit être attentivement surveillée par l'examen systématique des oreilles. Dès son apparition, les lapins en contact avec les malades seront séparés et on soumettra les galeux au traitement suivant : enlever les croûtes avec de l'eau savonneuse tiède et un écouvillon de coton, rincer à l'eau tiède, puis sécher, et introduire dans l'oreille une petite quantité de baume de Pérou, en massant légèrement la base

de l'organe. Des insufflations de fleur de soufre et des lavages au polysulfure de sodium à 5 p. 1.000 réussissent également bien.

Gale de la tête et des pattes. — Due à Sarcoptes scabiei, cuniculi, ou à Notoedres cati. Envahit l'extrémité des pattes et du nez qu'elle couvre de squames. Moins fréquente que la précédente, elle présente cependant la même contagiosité. On peut la traiter au moyen de frictions avec la pommade d'Helmerich, mais il est préférable de sacrifier les malades et de désinfecter les locaux.

D. — Maladies des cobayes.

Pneumonie et broncho-pneumonie. — Très fréquentes et très contagieuses, ces affections sont provoquées par des pasteurella. Les symptômes observés sont peu nets. Les malades se mettent en boule, les poils hérissés, s'immobilisent et maigrissent. Souvent du jetage apparaît en même temps que de la dyspnée. La mort survient en quelques jours. A l'autopsie on trouve des épanchements cavitaires et des lésions inflammatoires pulmonaires et pleurales.

Maladie du nez. — Elle a souvent pour cause la « sortie » d'un pseudo-pneumocoque chez des animaux sensibilisés par des inoculations diverses : microbes vivants ou morts, toxines (M. Nicolle). Ses symptômes consistent en un jetage séreux, puis purulent, qui obstrue peu à peu les cavités nasales, de l'amaigrissement et une dyspnée accentuée. La mort se produit après un temps variable qui peut atteindre plusieurs semaines. Dans la forme nasale pure, on observe seulement de la dégénérescence graisseuse du foie ; dans la forme broncho-pulmonaire, le poumon enflammé est carnifié. La péritonite avec épanchement est fréquente, la pleuro-péricardite assez rare.

Pseudo-tuberculose. — Provoquée par le cocco-bacille de Malassez et Vignal. Cette affection peut être aiguë ou chronique (Ramon). Le type septicémique évolue en 24-48 heures et ne détermine pas d'autre symptôme caractéristique qu'une dyspnée croissante. Dans la forme ganglionnaire, on observe des adénopathies sous-glossiennes, cervicales ou inguinales s'accompagnant de suppuration. Le type clas-

sique se traduit par une cachexie progressive qui amène la mort en une ou plusieurs semaines. Il n'existe de lésions typiques que dans cette dernière forme : nodules blancs, plus ou moins volumineux, disséminés à la surface de la rate ou envahissant le parenchyme hépatique hypertrophié ; abcédation des ganglions mésentériques. Les poumons sont parfois envahis par un semis de petits tubercules de dimensions variables.

Peste. — Due à un virus filtrant. Assez rarement observée.

Paralysie. — Assez rare. Décrite en Autriche par Römer, elle existe également dans les élevages de la région parisienne. Le train postérieur des cobayes devient mou, puis se paralyse tout à fait et l'animal traîne les membres en extension quand il se déplace. Mort en 15 à 20 jours.

E. — **Maladies des rats et souris.**

Septicémie des souris. — Due à un bacille décrit par Koch. Somnolence, dyspnée, mort rapide.

Typhose. — Due à des bacilles paratyphiques, dont b. typhi murium.

Sarcosporidiose. — Détermine une dégénérescence particulière du tissu musculaire et se traduit par de fines traînées blanchâtres le long des fibres.

Teignes. — Fréquentes.

CHAPITRE XV

CONTENTION ET ANESTHÉSIE DES ANIMAUX D'EXPÉRIENCES — DIFFÉRENTS MODES D'INFECTION EXPÉRIMENTALE. — PONCTION DU CŒUR. — ÉPILATION. — AUTOPSIES — ENFOUISSEMENT ET INCINÉRATION DES CADAVRES — TEMPÉRATURES NORMALES

A. — Contention.

Les moyens de contention varient avec les différentes espèces animales employées.

Les souris et les rats peuvent être manipulés avec des pinces à mors de dimensions variables. On les saisit par la peau de la nuque et par la base de la queue, de façon à les immobiliser complètement.

Les cobayes et les lapins sont maintenus avec les mains par un aide pour les opérations courantes.

S'il s'agit d'interventions délicates (ponction intracardiaque, dénudation de la veine jugulaire, mise en place d'un sac de collodion dans le péritoine), ils doivent être fixés sur un plateau en zinc dont les bords relevés sont percés de trous. Aux quatre pattes, on attache des nœuds coulants dont les extrémités sont fixées aux bords du plateau par l'un des trous. Les dimensions de ces plateaux sont : pour les lapins de 0 m. 66 × 0 m. 40 ; pour les cobayes de 0 m. 46 × 0 m. 27.

Si une immobilisation plus complète est nécessaire, on peut avoir recours au mors de Malassez qui maintient la tête dans la position qu'on veut lui donner, ou à l'appareil de Latapie. Ce dernier est combiné pour s'adapter à tous les petits animaux de laboratoire.

Pour les plus gros animaux, employer la gouttière de Verdin.

B. — Technique pour l'épilation des animaux d'expériences.

Lorsqu'il est impossible, ou contre-indiqué, de se servir du rasoir pour épiler les animaux d'expériences en vue d'inoculations transcutanées (par exemple : vaccine, tuberculose), il est recommandable d'employer une solution épilatoire ne contenant pas d'arsenic. La meilleure est une solution aqueuse de monosulfure de sodium à 36 p. 100.

On badigeonne fortement la région à épiler avec un tampon d'ouate monté sur une tige de bois et imprégné de monosulfure, on laisse agir quelques instants et on lave rapidement à grande eau pour arrêter l'action caustique du liquide épilatoire. On essuie avec soin la peau, on la sèche, et on y étale aussitôt, avec un pinceau et une spatule, la substance virulente.

C. — Anesthésie.

Toutes les fois qu'une inoculation ou une opération peut entraîner de la douleur, on doit recourir à l'anesthésie.

L'emploi du chloroforme est souvent dangereux chez les animaux, particulièrement chez le lapin et chez le chien. Il faut donc éviter de s'en servir, sauf pour le cobaye et le chat qui le supportent assez bien.

On l'utilisera sous forme d'*eau chloroformée* pour l'insensibilisation des petits animaux à sang froid (vers, mollusques, grenouilles, etc.).

Les vapeurs dégagées par une petite quantité de chloroforme ou d'éther sous une cloche conviennent très bien pour insensibiliser les souris, les rats, les tortues, les lézards et les reptiles.

On peut aussi insensibiliser les reptiles, particulièrement les serpents venimeux, en leur pulvérisant de l'éther sur le crâne au niveau des hémisphères cérébraux.

On endort le cobaye (préalablement fixé sur l'appareil à contention) en lui faisant inhaler des vapeurs de chloroforme ou d'éther dégagées d'un petit tampon d'ouate placé au fond d'un cornet de papier dont on coiffe la tête de l'animal. L'extrémité du cornet doit être ouverte, de telle sorte

que l'air extérieur vienne aisément se mêler aux vapeurs de chloroforme.

Si l'on doit opérer sur le chat, il est plus commode de le placer d'abord sous une cloche à tubulure dans laquelle on introduit un tampon d'ouate hydrophile imprégné de chloroforme. Mais pour cet animal, comme pour le lapin, il est plus recommandable de se servir de *chloralose* qu'on administre *par ingestion* mélangé à un peu de lait par exemple, à la dose de 0 gr. 10 à 0 gr. 15, une demi-heure avant l'opération.

Chez le cobaye, le lapin et le singe de petite taille, on peut faire ingérer le chloralose à la sonde œsophagienne, — toujours une demi-heure d'avance, — à la dose de 0 gr. 15 pour le premier, de 0 gr. 30 à 0 gr. 40 pour les autres.

Le *chloralose* peut encore être injecté par voie intraveineuse chez le lapin dans la veine marginale de l'oreille, chez le singe et chez le chien dans la saphène externe, à la dose de 0 gr. 15 par kilogramme d'animal. Cette substance doit alors être dissoute dans de l'eau salée physiologique (à 7 gr. 5 de NaCl par litre). Sa solubilité est faible, — de 7 gr. 5 seulement par litre, — de sorte que la quantité à injecter est toujours assez considérable : 20 centimètres cubes de solution par kilogramme d'animal. C'est le seul inconvénient de cette méthode.

Lorsqu'il s'agit d'effectuer une laparotomie chez le cobaye, le lapin ou le singe, il vaut mieux recourir à l'injection *intrapéritonéale* d'un mélange d'hydrate de chloral et de morphine :

Hydrate de chloral.	10 gr. 0
Chlorhydrate de morphine.	0 gr. 05
Eau distillée.	100 cc.

(Stérilisation inutile à cause du pouvoir antiseptique du chloral.)

On en injecte 2 centimètres cubes au plus par kilogramme d'animal chez le cobaye ou chez le lapin, — généralement 1 centimètre cube est une dose suffisante ; — 3 à 4 centimètres cubes (suivant la taille) par kilogramme chez le chien.

La même solution, injectée *dans le muscle pectoral chez les oiseaux*, peut parfaitement être employée.

L'anesthésie obtenue par ce procédé est tout à fait inoffensive et complète. Elle est seulement un peu lente à s'établir : *10 à 20 minutes.* Mais elle persiste assez longtemps et permet de pratiquer très commodément les opérations les plus délicates sur les organes de l'abdomen. On évite les accidents d'asphyxie, qui viendraient à se produire, au moyen de la respiration artificielle et des inhalations d'oxygène.

Chez le cheval, on emploie les inhalations de chloroforme (l'animal couché par terre, sur le côté et solidement entravé), mais on doit, 3 ou 4 heures avant l'anesthésie, administrer à l'animal 0 gr. 50 de chlorhydrate de morphine en injection sous-cutanée.

Nota. — Les animaux à sang chaud qui ont été anesthésiés par *l'éther* ou par le *chloralose* doivent toujours être maintenus dans un endroit chaud et sec, — au voisinage d'une étuve par exemple, — pendant quelques heures après l'opération, car leur température est constamment abaissée et il faut en favoriser le relèvement progressif. Sans cette précaution il arrive souvent qu'ils succombent à des accidents pneumoniques.

D. — **Différents modes d'infection expérimentale.**

Lorsqu'on étudie expérimentalement la virulence d'une culture microbienne, il est souvent nécessaire de préciser le *poids* de microbes employés.

Pour peser des microbes on prélève, avec une anse ou une spatule stérilisée, une petite quantité de culture qu'on porte à la balance de précision, sur un petit carré de papier à filtrer stérile, préalablement taré dans un verre de montre. On en prend ainsi 10 milligrammes par exemple.

Ces microbes, essorés sur le papier-filtre, sont alors déposés dans un verre conique stérile où on les émulsionne soigneusement avec de l'eau physiologique stérile ajoutée d'abord goutte à goutte à la pipette effilée. On évite avec soin de faire des grumeaux.

On doit tabler, pour les calculs de dilution, sur le nombre moyen de microbes contenus dans 1 milligramme de cul-

ture. Avec le bacille tuberculeux (sur bouillon glycériné ou pomme de terre glycérinée) ce nombre moyen est de 40 millions par milligramme. Donc 0 mgr. 000.000.1 de culture = 4 bacilles et chaque bacille pèse environ 25 cent-millionièmes de milligramme.

L'infection expérimentale des petits animaux généralement utilisés dans les laboratoires, en particulier le cobaye et le lapin, est le plus souvent réalisée par simple inoculation sous-cutanée en plongeant l'aiguille à injection, sur la moitié de sa longueur environ, dans le tissu cellulaire, à la base d'un pli fait à la peau entre deux doigts, ou entre les mors d'une pince.

Il est toujours nécessaire de couper les poils aussi ras que possible et d'aseptiser la peau, soit par lavage à l'alcool, soit par badigeonnage à la teinture d'iode (effectué quelques minutes avant l'injection).

Les autres voies d'infection le plus commodément utilisées sont :

a) *Voie intrapéritonéale.*

Ne doit être employée que pour les émulsions d'organes frais ou pour les cultures pures. Il ne faut jamais en faire usage pour éprouver la virulence de crachats, de matières fécales, d'urines, de pus ou de produits de broyage d'organes provenant de cadavres putréfiés, car il en résulterait une péritonite mortelle, due aux microbes de putréfaction.

b) *Voie intravasculaire.*

Très facile dans la veine marginale de l'oreille chez le lapin. Chez le cobaye, il faut pratiquer l'injection dans la veine jugulaire qu'on doit mettre à nu par une incision et une dissection préalables. Aussitôt après, on pratique l'hémostase, soit au moyen d'une ligature, soit à l'aide d'une petite pince qu'on laisse en place pendant quelques minutes avant de refermer la plaie avec 2 ou 3 agrafes de Michel (*Fig.* 3 *et* 4).

L'infection du rat et celle de la souris par voie sanguine peuvent être aisément réalisées grâce à l'existence, chez ces petits rongeurs, de deux veines superficielles et facilement accessibles, qui sont visibles latéralement à la base de la queue. Il faut faire usage de très fines aiguilles analogues

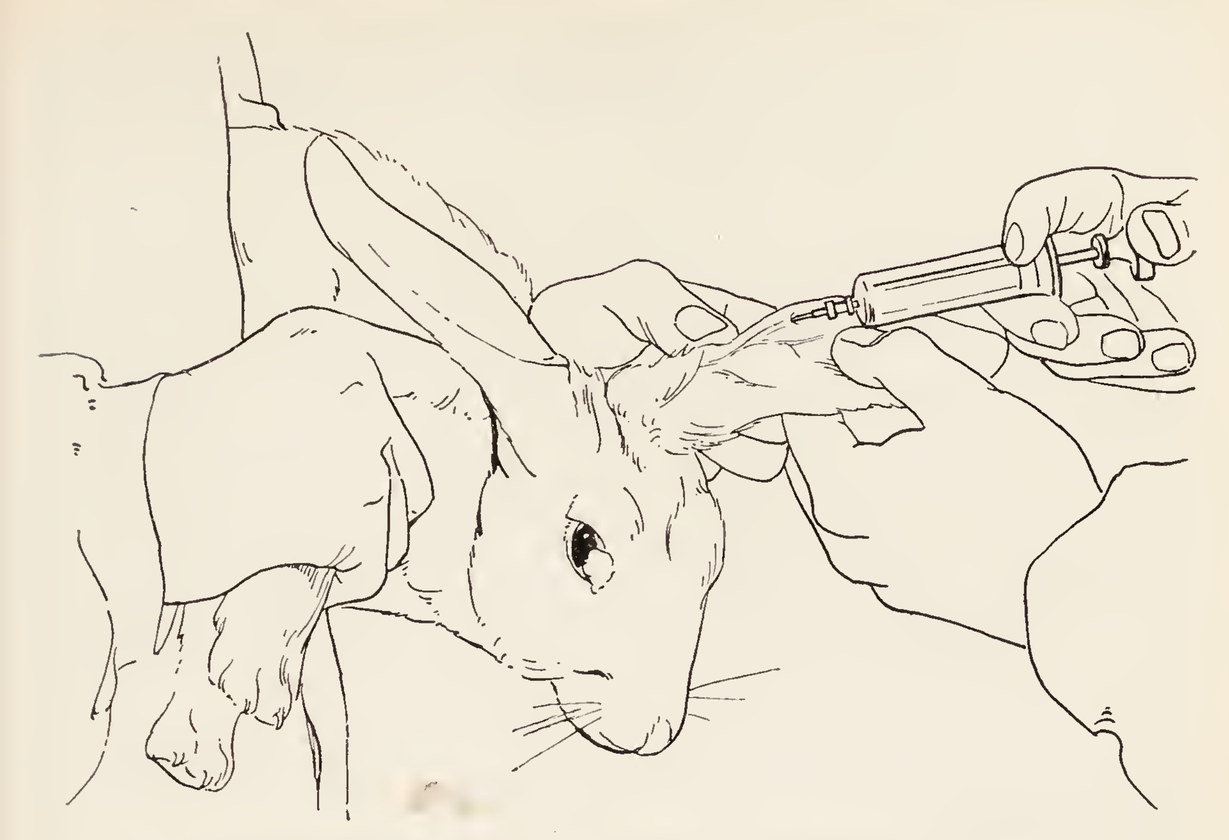


Fig. 3. — Inoculation intraveineuse chez le lapin (dans la veine marginale de l'oreille).

à celles qu'emploient les dentistes pour les injections de liquides anesthésiques dans la gencive. On peut introduire dans la veine d'une souris jusqu'à 1 centimètre cube de liquide. L'animal étant immobilisé par un aide, l'opérateur saisit, avec la main gauche, la queue dont il appuie la base

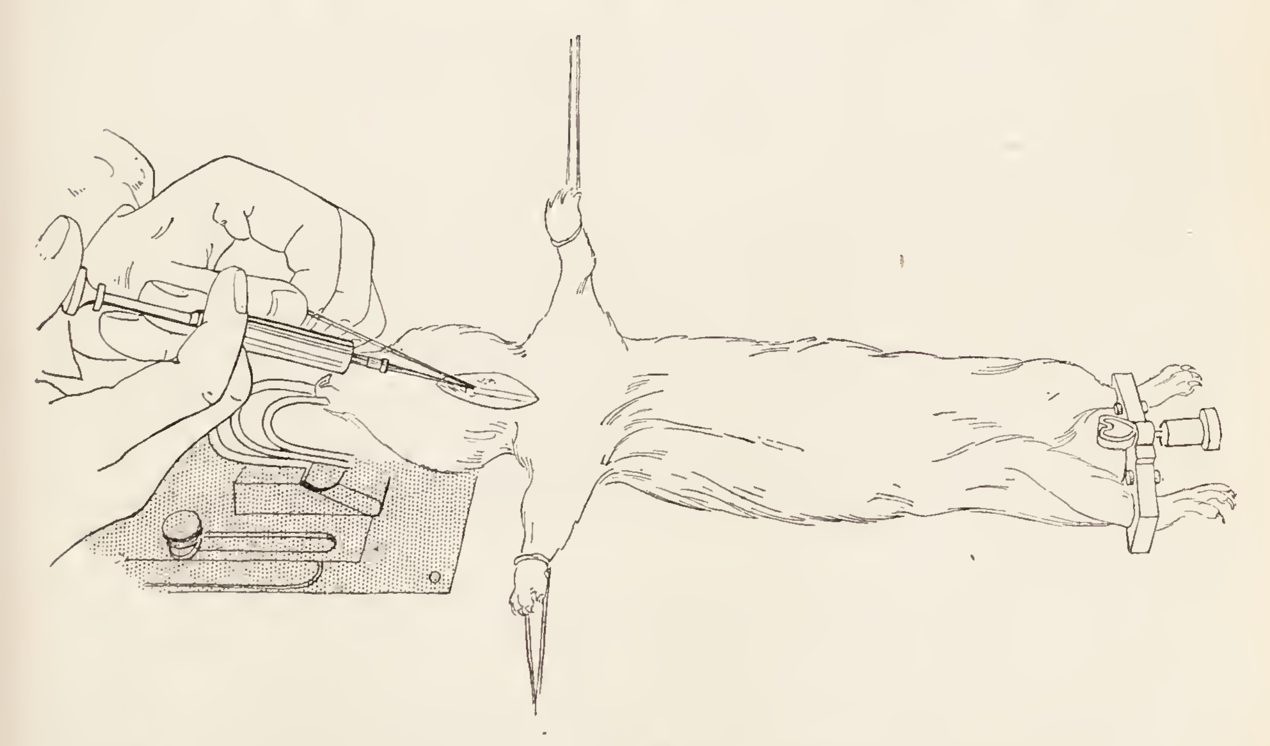


Fig. 4. — Inoculation intraveineuse chez le cobaye (dans la veine jugulaire mise à nu).

sur son index et pique parallèlement au vaisseau. En retirant lentement la pointe de l'aiguille, on évite la sortie de la moindre goutte de sang.

c) *Voie intracranienne et voie intrarachidienne.*

On injecte les liquides sous la dure-mère, ou dans l'un des hémisphères cérébraux qu'on atteint aisément en pratiquant sur le vertex, sur une ligne transversale passant par la commissure postérieure des deux yeux, une petite incision de la peau et un minuscule trou à la boîte cranienne, au moyen d'un foret pourvu d'un curseur de réglage. Par cet orifice, qu'on a soin de percer un peu à droite ou à gauche de la ligne médiane (pour ne pas atteindre le sinus veineux longitudinal supérieur), on plonge l'extrémité de l'aiguille à 4 ou 5 millimètres de profondeur et on pousse très doucement l'injection, dont le volume ne doit pas dépasser 4 à 5 gouttes.

Une autre méthode, beaucoup plus inoffensive et plus élégante, est l'injection *post-orbitale*. En voici la technique :

L'animal, — cobaye ou lapin, ayant la tête bien immobilisée horizontalement, on glisse, par un mouvement semicirculaire, la pointe d'une aiguille de seringue à injection, tenue par son pavillon, de dehors en dedans et d'avant en arrière, le long de la cavité orbitaire, en suivant la face interne du globe de l'œil et sans piquer celui-ci. Lorsque la pointe arrive tout à fait à la partie postérieure de l'orbite, un léger mouvement de bascule de bas en haut fait pénétrer l'aiguille par le trou orbitaire jusque sous le chiasma des nerfs optiques et sans que ceux-ci puissent être lésés. L'aiguille avertit l'opérateur qu'elle est en bonne place lorsqu'elle joue librement dans le trou orbitaire, sans buter contre une paroi osseuse. On pousse alors l'injection qui, pénétrant entre la dure-mère et la pie-mère, se mélange au liquide céphalo-rachidien. L'aiguille brusquement retirée ne laisse aucune plaie et l'opération ne cause aucun trouble à l'animal.

L'inoculation *intrarachidienne* se fait par ponction lombaire en introduisant une aiguille d'acier d'arrière en avant entre les lames vertébrales de l'avant-dernière vertèbre lombaire, jusque dans la cavité médullaire dans laquelle flotte la queue de cheval. Il est indispensable d'inciser

préalablement la peau sur une longueur d'environ 1 centimètre au niveau de l'apophyse épineuse de la 4e vertèbre lombaire. Avec l'ongle de l'index de la main gauche, on détermine exactement celle-ci et, immédiatement en avant, on plonge d'arrière en avant l'aiguille dont le pavillon doit rester libre pour permettre l'écoulement au dehors de quelques gouttes de liquide céphalo-rachidien. Cet écoulement atteste que l'aiguille est bien en place. Il ne reste plus qu'à y adapter le bec de la seringue chargée de substance infectante et à pousser doucement l'injection dont le volume ne doit pas dépasser 0 cc. 5 pour le cobaye, 1 centimètre cube pour le lapin. Lorsque celle-ci est terminée, on retire brusquement l'aiguille, on ferme la petite plaie cutanée avec une agrafe de Michel et on touche à la teinture d'iode.

d) *Voie oculaire.*

L'inoculation par cette voie se réalise, soit en introduisant directement le virus dans la chambre antérieure de *l'œil*, soit par simple *instillation sur la conjonctive.*

L'inoculation dans la chambre antérieure de l'œil se fait le plus commodément chez le lapin.

On fixe le globe oculaire en enserrant, au moyen d'une

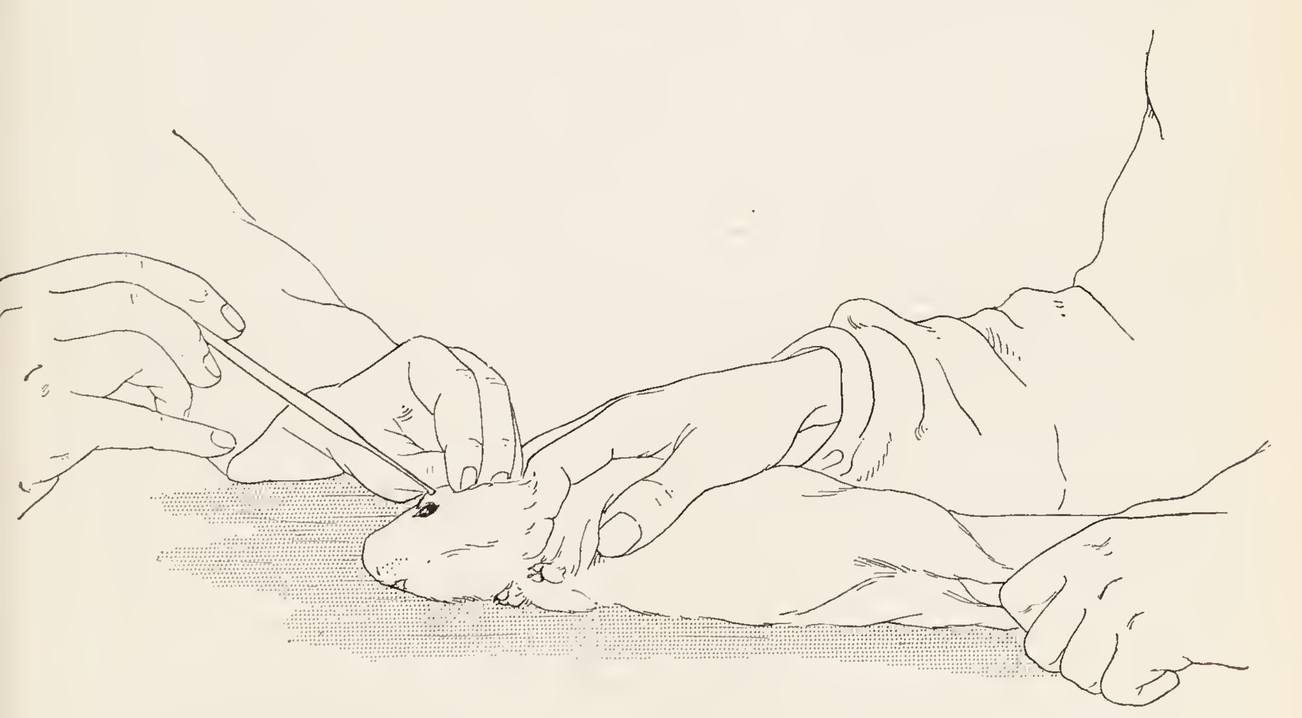


Fig. 5. — Instillation sur l'œil d'un cobaye.

pince à dents de souris, un pli de la conjonctive un peu en dehors du bord supérieur de la cornée, et, avec la pointe

d'une aiguille fine, on pique celle-ci très obliquement, de manière à ne pas blesser l'iris. On laisse écouler librement quelques gouttes d'humeur aqueuse, puis on adapte la seringue sur le pavillon de l'aiguille et on pousse doucement l'émulsion microbienne dans la chambre antérieure de l'œil, en ayant soin de n'injecter qu'une quantité de liquide assez faible pour ne pas produire de surpression.

Si l'on retire brusquement l'aiguille, la petite plaie cornéenne se referme aussitôt et il ne reste plus qu'à laver la surface de l'œil avec un peu d'eau stérile ou une solution boriquée à 3 p. 100.

L'instillation simple se fait en laissant tomber, avec la pointe d'une pipette effilée, une goutte d'émulsion microbienne à la surface du globe oculaire, un aide tenant les paupières de l'animal écartées. On attend quelques instants et on remet l'animal dans sa cage (*Fig.* 5).

e) *Voies digestives.*

L'infection par les voies digestives est, à proprement parler, la plus *naturelle.*

Sa technique consiste, soit à faire, dans la cavité buccale ouverte, un simple badigeonnage de la face interne des joues avec un pinceau imprégné de substance virulente, soit à faire absorber les microbes en les introduisant directement dans l'estomac au moyen d'une seringue et d'une sonde œsophagienne qui, pour le cobaye, est une sonde uréthrale de petit calibre, en gomme. Pour empêcher que celle-ci soit coupée par les incisives de l'animal, on tient les mâchoires convenablement écartées au moyen de deux lacets plats et; la tête étant dirigée en haut, on glisse doucement le bec de la sonde le long du voile du palais. On est sûr d'avoir pénétré dans l'œsophage si les mouvements respiratoires restent bien réguliers et s'il ne se produit pas d'efforts de toux.

f) *Voie rectale.*

Pour éviter l'expulsion immédiate des émulsions microbiennes injectées dans le rectum, il convient de porter celles-ci aussi haut que possible (à 5 centimètres environ chez les cobayes) avec une petite sonde très fine et très flexible en caoutchouc rouge.

g) *Voie vésicale.*

On réalise ce mode d'infection en introduisant sans violence dans l'urèthre, jusqu'à une profondeur de 3 centimètres chez le cobaye, une petite sonde molle de Gaillard du modèle le plus fin. La sonde doit avoir été préalablement stérilisée par le formol, puis trempée dans de l'huile aseptique. On attend l'écoulement de l'urine et on injecte, sous le plus faible volume possible, l'émulsion microbienne.

h) *Voie respiratoire.*

L'infection par inhalation peut se réaliser dans chacun des segments de l'appareil respiratoire : nez, bouche, pharynx, larynx, bronches, alvéoles pulmonaires, et il est très difficile, — on peut même dire impossible, — de la localiser dans l'un quelconque de ces segments. On parvient cependant à éviter les premiers (nez, bouche, pharynx, larynx) en injectant directement, au moyen d'une seringue, le virus dans la trachée, ou en pulvérisant l'émulsion microbienne dans l'arbre bronchique après trachéotomie.

L'inoculation intratrachéale se fait en incisant la peau sur la ligne médiane du cou, puis en dénudant la trachée avec une sonde cannelée. On pousse alors l'injection en enfonçant l'aiguille de la seringue entre deux anneaux. Chez les petits animaux, il est plus pratique de passer un fil sous la trachée et de l'attirer au dehors.

L'inhalation simple peut être réalisée en immobilisant l'animal, cobaye ou lapin, sur une planche, de telle sorte que sa tête pénètre à travers la fente étroite d'une membrane de caoutchouc tendue sur l'ouverture la plus large d'une allonge en verre pourvue de deux tubulures. Par l'une de celles-ci, située en face de la tête, on fait pénétrer, dans les conditions que l'on désire, les poussières infectantes mélangées à de l'air comprimé. L'excès d'air et de poussières est entraîné au dehors par l'autre tubulure placée en haut de l'allonge, après avoir barbotté dans de l'acide sulfurique contenu dans un flacon laveur.

i) *Voie transcutanée.*

On rase ou on épile soigneusement (voir ce chapitre, B) une étendue variable de la partie supérieure et postérieure du cou, de telle sorte que l'animal ne puisse pas se lécher,

et on étend l'émulsion microbienne, avec une spatule, sur la surface *fraîchement rasée* ou *épilée.*

j) *Voie intra-mammaire.*

Chez un cobaye femelle en lactation, on plonge l'aiguille de la seringue dans le tissu glandulaire, à la base de la mamelle.

Chez la vache ou la chèvre, on se sert d'un tube trayeur ou d'une sonde flexible en caoutchouc qu'on introduit dans les canaux galactophores, de telle sorte qu'avec une seringue on puisse injecter directement dans les acini glandulaires la substance infectante.

k) *Voie intravésiculaire ou intra-intestinale après laparotomie.*

Chez le cobaye, et plus facilement chez le lapin, on peut introduire directement le virus dans la vésicule biliaire préalablement mise à nu, ou dans une anse intestinale. Il est alors essentiel d'anesthésier complètement l'animal (par injection intrapéritonéale de chloral-morphine, comme il a été dit plus haut dans ce même chapitre, en C) avant de procéder à la laparotomie, afin d'éviter les efforts qui entraîneraient la propulsion des intestins hors de la cavité abdominale.

L'animal étant attaché sur un plateau, la région à opérer est rasée, puis aseptisée à l'alcool et à la teinture d'iode. On incise d'abord les téguments, puis la ligne blanche. On déchire avec le bec d'une sonde cannelée le péritoine, et le foie apparaît. On l'attire en bas et on le renverse de bas en haut et d'arrière en avant : sa face postérieure (par rapport à l'animal) est ainsi mise à jour (technique de *Violle*).

En interposant des tampons de gaze entre la coupole diaphragmatique et le foie, puis en bourrant l'espace intermédiaire entre le foie et les intestins, on « cale » la masse hépatique. On passe, sous le col de la vésicule ainsi dégagé, un fil de soie monté sur une aiguille de Reverdin et on lie le canal cholédoque.

A l'aide d'une seringue stérile de 5 cc. on ponctionne la vésicule à son pôle libre, on aspire le contenu qui, dans beaucoup de cas, est un liquide épais et visqueux. En diluant ce liquide et en lavant la poche à plusieurs reprises avec de l'eau physiologique jusqu'à ce qu'elle sorte complè-

tement incolore, on a un réservoir de 1/2 à 1 cc. 1/2 de capacité, prêt à recevoir l'émulsion microbienne.

Celle-ci est aspirée dans une seconde seringue. L'aiguille de la première étant toujours en place, on pousse l'injection doucement. On passe un fil de soie comprenant dans sa boucle l'aiguille et la paroi vésiculaire légèrement soulevée et tendue par une pince. Tout en dégageant l'aiguille on serre le fil, de telle sorte que, celle-ci étant complètement retirée, aucune goutte du liquide ne puisse sortir. Enfin, pour plus de sûreté, on met une pointe de feu sur l'orifice avec une tige de platine rougie à la flamme. On enlève les tampons, on suture la ligne blanche à l'aide de trois ou quatre points de catgut. Les téguments sont réunis ensuite par quelques agrafes de Michel. On badigeonne à la teinture d'iode la plaie suturée et on recouvre celle-ci d'un peu de collodion.

On opère de la même manière pour l'injection directe dans une anse intestinale.

m) *Voies intrapleurale, intra-articulaire*, etc.

On peut être amené à varier les conditions d'infection en s'adressant à d'autres modes d'inoculation exceptionnellement usités. C'est ainsi qu'il est parfois utile d'introduire une émulsion de culture directement dans la cavité pleurale ou dans une articulation. Le lieu d'élection pour la ponction de la plèvre, effectuée avec l'aiguille libre ou montée sur la seringue, est le *quatrième espace intercostal droit*.

Les cavités articulaires s'atteignent facilement en plaçant le membre en extension forcée.

E. — **Ponction intracardiaque.**

Avec un peu d'exercice on arrive très facilement à effectuer, chez le cobaye ou le lapin, la ponction intracardiaque sans que ces animaux en souffrent. C'est un procédé très commode pour se procurer, sans opération sanglante et sans sacrifier les animaux, du sang frais, aseptique, soit pour en séparer le sérum par centrifugation immédiate et obtenir ainsi de l'alexine fraîche, soit pour le mélanger à divers milieux de culture (par exemple le milieu de *Novy-Neal-Ch. Nicolle*).

L'animal étant fixé sur le dos bien horizontalement, on aseptise la région sternale par un badigeonnage iodé après rasage. On plonge d'un coup brusque, et un peu obliquement de bas en haut et d'avant en arrière, dans l'un des ventricules du cœur, la pointe d'une aiguille dont le pavillon est libre. Si le sang sort aussitôt par celle-ci en saccades, on y adapte rapidement le bec d'une seringue stérile de 10 à 20 centimètres cubes et on aspire avec lenteur le sang jusqu'à ce que le corps de pompe soit rempli, puis on retire brusquement l'aiguille.

Le meilleur point de repaire pour la ponction intracardiaque est, chez le lapin, dans le 3e espace intercostal gauche, à 3 millimètres en dehors du bord du sternum : l'aiguille plonge, à ce niveau, dans le ventricule droit.

Chez le cobaye, le lieu d'élection se trouve sur le bord gauche du sternum, de 8 à 10 millimètres au-dessus du sommet de l'angle formé par la base de l'appendice xyphoïde et le dernier cartilage costal articulé avec le sternum. L'aiguille, – qui doit être enfoncée à 15 ou 17 millimètres de

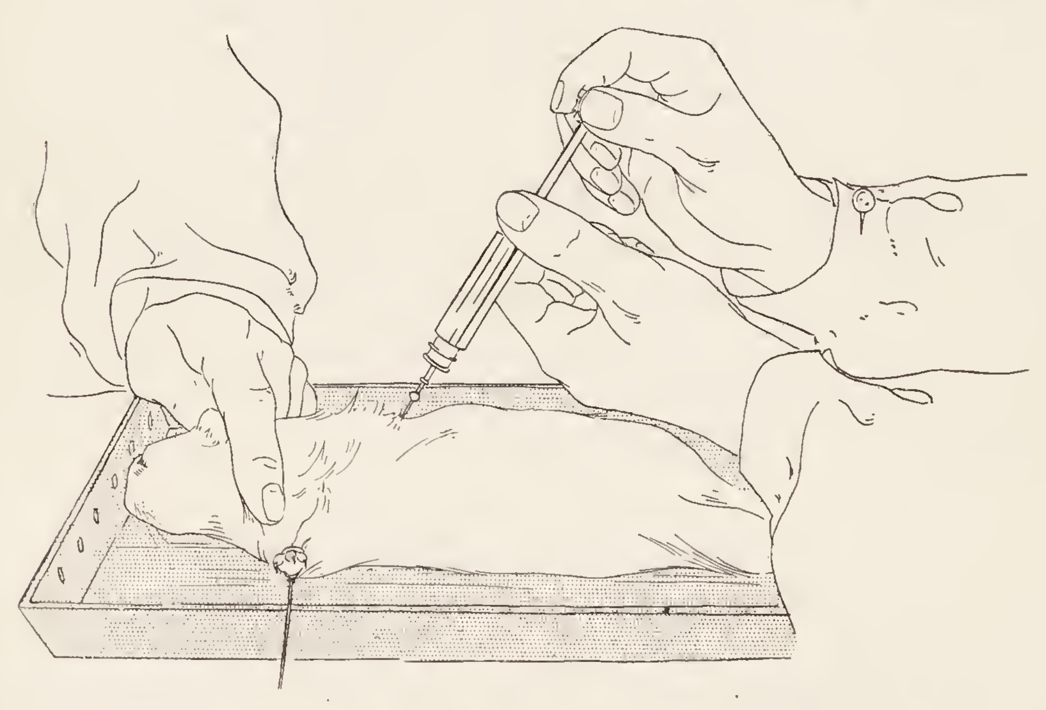


Fig. 6. — Ponction du cœur du cobaye au lieu d'élection.

profondeur, — pénètre ainsi au-dessus de l'avant dernière articulation chondro-sternale et va piquer le ventricule gauche. Plus haut elle atteint l'oreillette. Plus bas elle traverse le diaphragme et va piquer le foie. Il faut incliner l'aiguille légèrement en dedans vers la ligne médiane (*Fig.* 6).

Cette petite opération est tout à fait inoffensive lorsque la quantité de sang prélevée ne dépasse pas 10 centimètres cubes pour les cobayes de 500 grammes et 25 centimètres cubes pour les lapins adultes. Si l'on emploie des aiguilles dont le biseau n'est pas trop allongé ni trop coupant, on peut la répéter plusieurs fois à quelques jours d'intervalle, chez les mêmes animaux, sans qu'il en résulte d'hémorragie intra-péricardique.

F. — **Autopsies animales.**

Elles doivent être faites le plus tôt possible après la mort.

Avant tout examen, les cadavres des animaux sont fixés dans une immobilité aussi absolue que possible.

Les souris sont placées ventre en l'air, sur une plaque de liège à laquelle on les fixe par les pattes et par le museau, à l'aide d'épingles.

Les cobayes et les lapins sont attachés par les pattes aux bords des plateaux de zinc dont nous avons déjà indiqué les dimensions. Les poules et les pigeons sont maintenus de la même façon par le cou et les deux pattes.

Les animaux une fois fixés, les poils des parois thoracique et ventrale, où doit porter l'incision, sont sectionnés, ou les plumes arrachées. Les poils ou les plumes des régions voisines sont imbibés d'eau de façon à les rendre adhérents et à les empêcher de s'envoler ou de se fixer sur instruments et les organes au cours de l'autopsie.

On explore alors les diverses parties du corps en observant spécialement le point d'inoculation et ses alentours.

Puis on fait une incision cutanée médiane, du cou au pubis, qu'on complète par quatre incisions latérales jusqu'aux membres. On détache alors la peau des parties sous-jacentes et on la rabat extérieurement.

La paroi musculaire du thorax et de l'abdomen étant ainsi mise à nu, ouvrir le ventre avec des ciseaux, examiner l'état du péritoine et en recueillir tout de suite l'épanchement si cela est nécessaire.

Après le péritoine, tous les organes de la cavité abdominale (foie, rate, reins, capsules surrénales, intestins, vessie, organes génitaux) doivent être passés en revue. Noter l'état des ganglions mésentériques.

L'autopsie de l'abdomen étant terminée, le thorax est ouvert en sectionnant, de chaque côté, la cage osseuse. (Pour la poule, le lapin et les plus gros animaux, employer le costotome.) On observe l'état des plèvres, des poumons, du péricarde, des ganglions médiastinaux.

Pour prélever stérilement du sang du cœur, on en saisit l'extrémité avec une pince, on brûle sa paroi antérieure avec une tige chaude ou avec une large spatule, on introduit par le même point une pipette dans la cavité cardiaque et on aspire doucement le sang en donnant à la pipette un léger mouvement de va et vient, puis on la retire.

Les prélèvements dans le foie, la rate, le rein, etc., sont faits de la même façon. Pour prélever la moelle osseuse, sectionner un os long transversalement, cautériser l'une des surfaces de section, introduire dans le canal médullaire l'extrémité d'une pipette stérilisée et aspirer.

Pour les prélèvements des centres nerveux, voir *Rage*.

G. — Technique pour l'enfouissement et pour l'incinération, sans four crématoire, des cadavres d'animaux d'expériences.

a) L'enfouissement des cadavres des petits animaux d'expériences doit toujours être effectué avec les précautions suivantes : on creuse dans le sol un trou de dimensions convenables, à 0 m. 50 de profondeur au moins, et on en garnit le fond d'un lit de chaux vive de 0 m. 02 d'épaisseur environ. Sur ce lit, on dispose les cadavres (qu'on aura pu accumuler depuis quelques jours dans une poubelle métallique fermée, remplie de solution de crésyl à 5 p. 100), et on les recouvre d'une nouvelle quantité de chaux vive, puis de terre meuble.

La quantité de chaux vive à employer est, au total, 1 kilogramme par 10 kilogrammes de cadavres.

S'il s'agit de cadavres d'animaux morts de maladies très contagieuses (peste, charbon, etc.), il est indiqué de mélanger à la chaux vive environ 10 p. 100 de chlorure de chaux sec du commerce.

b) On pratique très commodément l'incinération des cadavres d'animaux d'expériences, partout où l'on ne dis-

pose pas d'un four crématoire, en creusant dans le sol une cavité rectangulaire à bords évasés, au fond de laquelle on étend une couche de branchages aussi secs que possible, ou de copeaux de bois, sur 15 à 20 centimètres d'épaisseur, et de telle sorte que l'air ait un facile accès sous ce petit bûcher. Sur ce lit combustible on étale les cadavres. On les arrose ensuite, d'abord d'une petite quantité de goudron (300 grammes environ pour 10 kilogrammes de cadavres), puis de 20 centilitres environ de pétrole, et on enflamme. La combustion est rapide et totale.

H. — Températures normales des animaux d'expériences.

Les oscillations de température autour de la moyenne normale obéissent à un rythme variable pour chaque espèce et même pour chaque animal. D'où la nécessité d'établir ces variations avant chaque expérience.

La température rectale moyenne pour les divers animaux est, d'après *Ch. Richet* :

Mammifères.	
Cobaye.	39°2
Lapin.	39°5
Chien.	39°2
Singe.	38°3
Chat.	38°8
Mouton.	38°6
Porc.	39°7
Bœuf.	39°
Cheval.	37°7
Oiseaux.	
Poules et pigeons. . . .	42°5
Canards.	42°2

I. Poids moyen des cobayes aux divers âges.

A la naissance, poids moyen. . . .		74 gr
1er jour	»	72 gr.
5e »	»	98 gr.
10e »	»	137 gr.
15e »	»	173 gr.
20e »	»	196 gr.
25e »	»	221 gr.
1 mois	»	240-250 gr.
2 »	»	350-400 gr.
3 »	»	450-500 gr.
4 »	»	550-600 gr.
6 »	»	650-700 gr.

Les cobayes uniquement nourris du lait de la mère ne

tardent pas à mourir. Les cobayes sans lait se développent moins bien pendant le 1er mois. Il leur faut donc un régime mixte.

J. — Rapport du sang au poids du corps chez diverses espèces animales.

Bovidés	1 p. 30
Solipèdes	1 p. 18
Mouton	1 p. 24,5
Chien	1 p. 18
Chat	1 p. 35
Oiseaux	1 p. 29
Rat	1 p 29
Cobaye	1 p 30
Lapin	1 p 31,5

CHAPITRE XVI

MÉTHODES DE CULTURE IN VIVO

(*Procédé des sacs de collodion ou de moelle de roseau.*)

A. — Préparation des sacs de collodion pour cultures in vivo.

La meilleure technique pour préparer les sacs de collodion consiste à utiliser comme moules soit, comme l'a fait *Maurice Nicolle*, des cylindres en sucre candi fondu, bien secs et lisses, auxquels il est facile de donner les formes et les dimensions les plus variables, soit des tubes à essai ou des tubes fermés en cul-de-sac à l'une de leurs extrémités, puis perforés de dehors en dedans, au milieu de cette extrémité, d'un seul orifice de 1 à 2 millimètres de diamètre.

On bouche ce trou du verre avec une solution épaisse de gélatine. On laisse sécher à l'étuve à 37°.

Lorsque la gélatine est bien sèche, on plonge le tube dans un bain de collodion, en évitant avec soin de faire des bulles d'air, on le retire aussitôt pour l'égoutter et on lui imprime un mouvement de rotation transversale entre les doigts, pour que l'évaporation de l'éther s'effectue rapidement et régulièrement.

Dès que le collodion est sec, on plonge le tube dans de l'eau tiède, à 40° environ, et on en remplit l'intérieur. L'eau dissout peu à peu la gélatine et on attend que le sac de collodion apparaisse libre à la surface du verre. En soufflant légèrement par l'extrémité ouverte du tube, on le démoule avec la plus grande facilité.

Il ne reste plus qu'à fixer le sac sur un support formé, par exemple, d'un tube de verre de même diamètre, étranglé et pouvant être scellé ou obturé par un bouchon, avec une couche de collodion appliquée à sec, au pinceau, ou avec une ligature au fil de lin ou de soie. On le stérilise ensuite dans un tube à essai contenant un peu d'eau.

Procédé d'Auguste Lumière et Jean Chevrotier :

Pour éviter les ruptures qui se produisent au moment du décollement du sac, ces auteurs ont modelé, au moyen d'une pâte plastique, consistante et soluble dans l'eau, de petits moules ayant la forme et les dimensions que l'on désire donner aux sacs. Le mélange est constitué par 1 partie de sirop de glucose et 2 parties de sucre en poudre dit « sucre glace ».

La manipulation et le modelage de ces moules doivent s'effectuer avec les doigts, légèrement imprégnés d'eau, ou des instruments mouillés, pour éviter l'adhérence de la pâte aux mains de l'opérateur ou aux outils de modelage.

Ces moules sont fixés à l'extrémité d'agitateurs en verre ou de tiges métalliques et immergés dans un collodion à 4 p. 100 de nitro-cellulose. On imprime à la tige de soutien un mouvement de rotation pour répartir uniformément la couche de collodion ; on laisse sécher, puis on suspend le dispositif ainsi préparé à la partie supérieure d'un récipient rempli d'eau.

Le liquide traverse l'enveloppe perméable, dissout la masse sucrée et, au bout de 2 heures environ, le sac se trouve libéré.

L'orifice de ces sacs peut être très petit, permettre seulement le passage d'une aiguille creuse, de sorte que leur occlusion est aisément réalisée et leur étanchéité peut être assurée.

B. — Préparation du collodion pour disques et sacs dialyseurs.

Pour un litre :

Coton azotique (bien échardé, sans grumeaux ni amas)	40 gr.
Alcool absolu.	300 cc.

Laisser tremper au minimum 24 heures, agiter de temps en temps. Ajouter :

Ether.	300 cc.

La dissolution se fait en une demie-heure environ. Remuer avec une baguette de verre. Ajouter :

Glycérine à 30° Bé.	90 cc.

Agiter, pour bien mélanger, avec une baguette. Compléter en ajoutant :

Alcool absolu. . . . . 400 cc.

Laisser ensuite mûrir 8 jours.

Les proportions ci-dessus sont les plus favorables pour les membranes *très perméables.*

Pour diminuer la perméabilité, on augmente la quantité d'éther jusqu'à 800 centimètres cubes d'éther pour 200 d'alcool.

Pour avoir des membranes minces, on peut réduire jusqu'à 20 grammes la quantité de coton azotique par litre.

La perméabilité des membranes est en raison directe de la quantité d'alcool et en raison inverse de la quantité d'éther que renferme le collodion.

C. — Sacs de collodion filtrants de L. Michel.

L. Michel a pu préparer des sacs de collodion susceptibles de résister à une pression intérieure de 20 à 30 centimètres de mercure et de servir à l'ultra-filtration microscopique.

On emploie à cet effet un collodion obtenu en dissolvant 2 gr. 5 de coton azotique dans 100 centimètres cubes d'un mélange à parties égales d'éther à 66° et d'acide acétique cristallisable.

Les toxines microbiennes ne sont pas retenues par ces membranes, tandis qu'elles le sont en partie ou en totalité par les bougies Chamberland et Berkefeld.

D. — Dénitrification des sacs de collodion.

On peut, comme l'ont montré *J. Duclaux* et *A. Hamelin*, dénitrer les sacs en collodion et les rendre ainsi plus commodément stérilisables par la chaleur sans trop diminuer leur perméabilité, au moyen du sulfhydrate d'ammoniaque du commerce étendu de 4 volumes d'eau et tiédi à 40°. On remplit le manchon filtrant de cette solution tiède et on le plonge dans un tube contenant la même substance, de telle sorte que la dénitrification se fasse simultanément sur les deux faces. L'opération est achevée en une demi-heure. On

rince ensuite le filtre avec de l'eau ammoniacale (pour empêcher le dépôt de soufre qui pourrait se produire par oxydation), puis avec de l'eau distillée.

Les filtres ainsi dénitrés ne sont pas modifiés par l'ébullition. Ils peuvent être stérilisés à l'autoclave et conservés secs. Dès qu'on les plonge dans l'eau, ils redeviennent instantanément perméables.

E. — **Sacs en moelle de roseau.**

Au lieu d'employer le collodion pour la préparation des sacs dialyseurs, on peut utiliser parfois très commodément, comme l'a proposé *Metchnikoff*, les tubes de moelle de *roseau commun* (*Phragmites communis*), qu'on ferme à leurs extrémités avec un fil imprégné de gomme-laque. Ces tubes de cellulose presque pure peuvent être stérilisés à l'autoclave aussi facilement que les sacs de collodion.

Ils sont plus résistants, plus minces et plus souples, par suite souvent préférables pour les inclusions intrapéritonéales.

Ils ont servi, en particulier, à la culture *in vivo* du microbe de la péripneumonie.

CHAPITRE XVII

LIQUIDES PHYSIOLOGIQUES ET LIQUIDES CONSERVATEURS DES PIÈCES ANATOMIQUES

A. — **Liquides physiologiques** (employés pour le lavage et la conservation des organes frais) :

1° *Liquide de Ringer-Locke* :

Eau distillée.	1 litre
NaCl.	8 gr.
Chlorure de potassium.	0 gr. 2
Chlorure de calcium.	0 gr. 2
Glucose pure.	1 gr.

Stériliser à froid par filtration au Chamberland.

2° *Solution trichlorurée de Carrel* :

Chlorure de sodium.	9 gr.
Chlorure de calcium.	0 gr. 25
Chlorure de potassium.	0 gr. 42
Eau distillée.	1.000 gr.

3° *Eau salée physiologique* (sérum artificiel simple)

NaCl pur.	8 gr. 1
Eau distillée.	1.000 cc.

Stériliser à 120° à l'autoclave, 20 minutes.

4° *Sérum salé et sucré* (*Ch. Richet*).

NaCl.	7 gr.
Lactose ou glucose.	5 gr.
Eau distillée.	1.000 cc.

5° *Eau de mer artificielle* (*E. Perrier*).

Chlorure de sodium.	18 gr.
Chlorure de magnésium.	11 »
Chlorure de potassium.	3 »
Sulfate de magnésium.	5 »
Sulfate de calcium.	3 »
Eau.	3.000 cc.

Stériliser à froid par filtration au Chamberland.

6° *Sérum de Trunecek* (hypertonique, médicamenteux).

Sulfate de soude.	0 gr. 44
Chlorure de sodium.	4 gr 92
Phosphate de soude.	0 gr. 15
Carbonate de soude.	0 gr. 21
Sulfate de potasse.	0 gr. 40
Eau distillée.	100 cc.

Stériliser à l'autoclave à 115°, 20 minutes.

7° *Sérum artificiel de Hayem.*

Chlorure de sodium pur.	5 gr.
Sulfate de soude.	10 gr.
Eau distillée	1.000 cc.

Filtrer et stériliser à l'autoclave.

8° *Liquide physiologique de Delbet.*

Chlorure de magnésium.	12 gr.
Eau distillée.	1 000 cc.

9° *Vernis de Carrel pour le pansement des greffes cutanées.*

Paraffine fusible à 52°.	189 gr.
Paraffine fusible à 40°.	6 gr.
Cire blanche.	2 gr.
Huile de ricin.	1 gr.

B. — **Liquides conservateurs des pièces anatomiques.**

a) *Liquides de Kayserling, modifiés par Bender* (pour les pièces fraîches) :

1° *1er bain.* Immerger aussitôt que possible la pièce et l'y noyer tout entière en s'assurant qu'elle est bien couverte d'ouate hydrophile :

Azotate de potasse.	45 gr.
Acétate de potasse.	90 gr.
Eau.	3.000 cc
Formol	600 cc.

Séjour 1 à 3 jours suivant volume, retirer, laver rapidement à l'eau et plonger dans :

2° Alcool à 90°, 3 ou 4 fois le volume de la pièce.

Séjour 1 à 3 jours, suivant volume, puis passage direct dans :

3° Liquide conservateur :

(a)	Eau distillée.	1.000 cc.
	Glycérine pure.	1.000 cc.
	Alcool à 90°.	250 cc.
	Acétate de potasse.	250 cc.

Lorsque la pièce a des couleurs très délicates qu'on désire bien conserver, au lieu de 3° (*a*) on les immerge dans 3° (*b*) :

(b)	Glycérine	1.600 cc.
	Eau distillée	800 cc.
	Acétate de potasse	800 gr.

Enfin, si l'on désire garder la pièce dans un liquide qui permettra d'y pratiquer ultérieurement des coupes microscopiques parfaites et colorables, on les immerge dans 3° (c) :

(c)	Alcool à 95°	2.600 cc.
	Eau distillée	4.000 cc
	Glycérine	800 cc.
	Acétate de potasse	400 gr.

Mais ce dernier liquide conserve mal les couleurs.

b) *Liquides de J. Binot* (Institut Pasteur).

1°	Acétate de soude fondu	40 gr
	Chlorate de potasse	5 gr.
	Azotate de potasse	10 ou 20 gr.
	Formol à 40 %	100 cc.
	Eau	1.000 cc.

plus :

ou bien : Sulfate de soude et azotate de potasse	20 à 30 gr.
ou bien : Sulfate de soude seul	20 à 30 gr.

Les pièces sont immergées dans le liquide et recouvertes d'ouate hydrophile.

Agiter de temps en temps le liquide.

Il est nécessaire de supprimer dans la pièce tout ce qui n'est pas utile à conserver ; en particulier, il est bon de vider les intestins si possible (ils dissolvent ultérieurement, dans les liquides, des matières colorantes gênantes). De même pour la bile.

Si la pièce est volumineuse, il est bon d'injecter dans le système vasculaire ce même liquide.

La durée de l'immersion est un temps délicat. Il faut que la pièce soit bien et complètement pénétrée, mais qu'elle y reste aussi peu que possible, sans quoi la couleur ne revient pas bien.

De toutes petites pièces seront laissées immergées quelques heures. Un rat par exemple, 24 ou 18 heures. Enfin de

plus grosses pièces 48 heures ou 3 jours, mais il ne faut guère dépasser cette durée. (*La pièce se décolore dans 1°.*)

2° La pièce est égouttée, puis immergée dans l'alcool à 90° où elle reprend sa couleur. A cet alcool on ajoute :

Acétate de soude fondu.	20 gr.
Sulfate de soude.	20 ou 10 gr.

par litre.

(Mieux vaut cependant commencer par alcool à 60°, puis alcool à 90°.)

Durée de l'immersion dans le ou les alcools : à peu près la même que dans 1°. Cependant, tant que la couleur augmente en intensité, on peut, en surveillant, laisser la pièce y séjourner plus longtemps. Par contre, — et c'est important, — si la pièce baisse de couleur, arrêter et plonger sans laver, mais en égouttant bien au préalable dans :

3° *Liquide définitif* :

Acétate de potasse.	150 gr.
Glycérine neutre.	250 cc.
Formol à 40 %.	2 à 3 cc.
Eau.	1.000 cc.

Les pièces sont définitivement conservées dans ce liquide où le formol a pour but d'empêcher les contaminations par cultures (de moisissures en particulier).

Si la pièce peut être recoupée, il est bon de faire une coupe fraîche, car la surface est toujours plus décolorée. Il suffit d'enlever 2 ou 3 millimètres avec un couteau à cerveau.

Remarques sur 1° :

Le chlorate de potasse avive la couleur, mais tend à faire ternir les pièces. Pour les muscles en particulier, on peut en diminuer la dose ou mieux le supprimer.

Pour les viscères, et principalement pour le foie, on ajoute à la solution 1° telle quelle, 2 gr. 50 à 10 grammes d'eau oxygénée fraîche.

Pour le foie on se trouve bien d'ajouter, par litre, 10 à 20 grammes d'*hydroquinone* préalablement dissoute dans un peu d'eau chaude (bocal plein et aussitôt fermé, pour éviter rapide réduction).

c) *Méthode de Sheridan Delépine.*

Particulièrement recommandable pour conserver les

pièces entières coupées en tranches de 1 à 2 centimètres d'épaisseur, avec leurs couleurs.

On commence par fixer les pièces en les laissant immergées pendant 3 jours à 2 semaines (selon leur épaisseur) dans la solution suivante :

Formol (sol. commerciale à 40 %). . .	100 cc.
Eau.	900 cc.
Sulfate de soude.	20 gr.

On porte ensuite pendant quelques heures dans un bain d'alcool à 90°, jusqu'à ce que la teinte initiale soit récupérée.

Puis on immerge pendant au moins 2 jours (il n'y a aucun inconvénient à prolonger davantage, jusqu'à 2 ou 3 semaines) dans :

Solution d'acide arsénieux (sat. à l'ébullition et préparée depuis au moins 12 heures). .	400 cc.
Glycérine pure.	600 cc.

On prépare finalement une gélatine glycérinée arsenicale en faisant séparément les deux solutions suivantes :

1) Gélatine Coignet (étiquette dorée). . . .	425 gr.
Solution saturée à chaud d'acide arsénieux.	1.500 gr.

On fait dissoudre la gélatine dans la solution chaude d'acide arsénieux.

2) Solution 1.	1.925 cc.
Glycérine pure, chaude.	5.760 cc.

Les deux solutions sont mélangées, puis refroidies aux environs de 20°. On y verse alors, en agitant fortement avec une baguette en verre, 6 blancs d'œufs battus et leurs coquilles broyées à part. On reporte sur le feu et on chauffe jusqu'au voisinage du point d'ébullition pour coaguler l'albumine et on maintient à la température d'environ 100° pendant 2 heures. Le liquide chaud est filtré à travers une flanelle, puis sur un papier Chardin à l'intérieur d'un autoclave dans lequel on entretient une température d'environ 50°. Cette filtration est assez longue.

Le milieu ainsi préparé est parfaitement transparent.

On en remplit le vase dans lequel on a disposé la pièce et on obture le bouchon avec de la colle adhésive au caoutchouc (voir chapitre VII, 1°) qu'on recouvre d'une bande de papier d'étain.

Ce procédé de Shéridan Delépine dérive de celui proposé

en 1896 par Nicolas pour l'inclusion des préparations anatomiques, lequel consiste à immerger les pièces d'abord pendant 24 à 48 heures dans une solution aqueuse de gélatine à 4 p. 100, maintenue à 25°, puis, pendant le même temps, dans une solution à 10 p. 100, et finalement dans une solution à 20 ou 25 p. 100 additionnée de 8 à 10 p. 100 de glycérine et maintenue à 35°. Après 48 heures on laisse refroidir dans un moule et on conserve la pièce dans du formol à 10 p. 120 d'eau distillée.

C. — Revivification des couleurs par la méthode de Fornario pour les petites pièces anatomiques conservées depuis longtemps dans le formol.

Ces pièces reprennent une couleur vive en les traitant comme suit :

Bain de 48 heures dans une solution de formol à 4 p. 100.

Bain de 24 heures (au plus) dans l'alcool à 90° (douze heures seulement pour les organes de petits animaux ou les fragments d'organes).

Reporter la pièce dans l'alcool à 90° neuf (3 ou 4 fois le volume de la pièce) auquel on ajoute goutte à goutte une quantité variable de la solution suivante (pas plus de 10 centimètres cubes par litre) :

Acide picrique (sol. aq. saturée).	100 cc.
Acide acétique glacial.	4 cc.

La couleur réapparaît en quelques minutes. Laisser les pièces dans cette solution pendant quelques jours, puis les reporter dans l'alcool à 90°. La couleur ne s'y modifie plus. On peut avantageusement ajouter à la solution picro-acétique une très petite quantité d'hémoglobine.

D. — Conservation des cadavres des petits animaux entiers ou ouverts, ou de grosses pièces anatomiques.

a) *Mixture de Goadby*. Dans 10 litres d'eau, on ajoute les doses suivantes de :

Sel de cuisine.	1.250 gr.
Alun ordinaire.	60 gr.
Bichlorure de mercure.	2 gr.

On peut remplacer le bichlorure de mercure par 1 gramme d'acide arsénieux et supprimer alors l'alun.

b) *Liquide de Müller.*

Bichromate de potasse.	20 gr.
Sulfate de soude.	10 gr.
Eau distillée	1.000 cc.

c) *Préparation des pièces anatomiques volumineuses destinées à être conservées ultérieurement à l'état sec.*

Le liquide d'imprégnation se prépare comme suit :

Eau	18 litres.
Alun.	600 gr.
NaCl.	150 gr.
Nitrate de potasse.	72 gr.
Potasse.	360 gr.
Acide arsénieux.	60 gr.

Faire bouillir jusqu'à dissolution bien complète, filtrer à froid, puis ajouter :

Glycérine.	8 litres.
Alcool à 95°.	2 litres.

Conserver en bonbonnes. Une grosse pièce (comme une tête entière) doit être immergée pendant 15 jours dans ce liquide. Une pièce moyenne, de 5 à 8 jours. On l'égoutte ensuite et on peut la conserver à l'état sec, à l'abri des poussières, sous vitrine par exemple.

E. — Injections intravasculaires de matières solidifiables.

Bleu de Prusse gélatiné. Solution aqueuse saturée de bleu, additionnée d'une solution à 4 p. 100 de gélatine fondue, tiède. On filtre à travers une flanelle au moment de l'usage.

Carmin gélatiné. Solution de carmin dissous dans l'ammoniaque à saturation. On en verse une quantité convenable pour bien colorer dans une solution un peu plus concentrée (à 6 ou 8 p. 100) de gélatine fondue, tiède. On filtre à travers une flanelle au moment de l'usage, après avoir pris soin de neutraliser l'excès d'ammoniaque par addition de quelques gouttes d'acide acétique. Mais il faut qu'il reste encore un peu d'ammoniaque libre, sans quoi le carmin se précipiterait.

TROISIÈME PARTIE

MICROBES DE L'EAU, DE L'AIR ET DU SOL

CHAPITRE XVIII

ANALYSE ET PURIFICATION DES EAUX POTABLES

A. — **Analyse.** — **Prélèvement des échantillons destinés aux analyses :**

2 flacons de 150 centimètres cubes chacun pour l'analyse bactériologique (flacons préalablement stérilisés et enveloppés de papier stérile),

1 tourie de 10 litres pour l'analyse chimique complète par un laboratoire spécial de chimie analytique.

(Tourie bien propre, lavée à l'eau acidulée, puis rincée à l'eau bouillie plusieurs fois et fermée avec un bouchon neuf bien étanche) ;

Ou bien deux litres pour analyse chimique partielle (analyse sanitaire) faite au laboratoire de microbiologie.

Pour l'analyse bactériologique, transport aussi rapide que possible des flacons dans une caisse fermant à clef, garnie de sciure de bois et de glace concassée en menus morceaux. *Les échantillons doivent rester dans la glace jusqu'au moment de l'analyse pour éviter la multiplication des germes microbiens.*

Lorsqu'il s'agit d'une captation nouvelle d'eau destinée à l'alimentation, l'envoi des échantillons devra toujours être accompagné d'une fiche de renseignements d'ordre géologique et géographique, indiquant le mode de captage, la nature du sol et du sous-sol, la nature et l'étendue probable du périmètre d'alimentation de la source ou de la

nappe aquifère envisagée, la situation du captage par rapport aux habitations, aux cimetières, aux dépôts de fumiers ou d'immondices, aux lavoirs publics ou privés, aux puits perdus, etc., qui peuvent se trouver dans le voisinage plus ou moins immédiat.

B. Analyse chimique.

Elle doit porter, au point de vue sanitaire, sur la recherche et le dosage de la matière organique, de l'ammoniaque, des nitrites, des chlorures et sur la détermination du degré hydrotimétrique (total et permanent). Les méthodes indiquées ci-après sont celles adoptées par le laboratoire du Conseil supérieur d'hygiène publique de France.

1° ***Evaluation de la matière organique par le permanganate de potassium.*** — Certaines matières organiques enlèvent plus d'oxygène au permanganate en *solution acide* qu'en *solution alcaline*. Le sucre cristallisé, le glucose, la dextrine, l'acide tartrique, l'acide oxalique, les macérations de substances végétales en absorbent davantage en *solution acide*. L'urine, les matières fécales, les produits de putréfaction des albuminoïdes en absorbent au contraire davantage en *solution alcaline*. L'albumine non désintégrée et l'urée n'ont que peu d'action. Le procédé dont il s'agit ne fournit donc que des indications comparatives et non des chiffres exacts. Quand on dit qu'une eau renferme x milligrammes de matières organiques par litre, cela signifie que l'ensemble des matières organiques d'origines diverses, contenues dans un litre de cette eau, est exprimé par x milligrammes d'oxygène emprunté au permanganate *soit en solution acide, soit en solution alcaline*.

La réaction est basée sur les données suivantes :

1 gramme de permanganate de potassium peut fournir 0 gr. 253 d'oxygène capable d'oxyder, par exemple, 1 gr. 994 d'acide oxalique cristallisé.

Pratiquement on emploie une solution à 0 gr. 5 de permanganate par litre. 1 centimètre cube de cette solution correspond à 0 gr. 125 d'oxygène et à 0 gr. 997 d'acide oxalique cristallisé pur.

On introduit respectivement 100 et 50 centimètres cubes

de l'eau à essayer dans deux fioles coniques d'Erlenmayer. On ajoute 10 centimètres cubes d'acide sulfurique au quart dans la première fiole et 5 centimètres cubes dans la seconde.

On introduit, d'autre part, respectivement 100 et 50 centimètres cubes de la même eau à essayer dans deux fioles coniques. On les alcalinise, la première par 10 centimètres cubes, la seconde par 5 centimètres cubes d'une solution saturée de bicarbonate de soude.

On verse dans chacune des 4 fioles exactement 10 centimètres cubes de la solution de permanganate de potassium à 0,5 p. 1.000

Les 4 fioles sont alors portées doucement à l'ébullition pendant 10 minutes. On laisse refroidir. Les deux épreuves alcalines sont rendues acides, en vue du titrage, par 20 centimètres cubes et 10 centimètres cubes d'acide sulfurique dilué volume à volume.

Chaque épreuve est alors successivement additionnée exactement de 10 centimètres cubes de sulfate ferreux ammoniacal (solution à 10 grammes par litre + 10 grammes d'acide sulfurique).

On revient immédiatement à la teinte rose faible en laisant tomber du permanganate à 0 gr. 5 p. 1000 contenu dans une burette graduée.

La différence volumétrique de permanganate trouvée entre une épreuve de 100 cc. et celle de 50 centimètres cubes qui lui correspond, représente l'oxygène consommé par la matière organique dans 50 centimètres cubes d'eau. On exprime les résultats en oxygène et en acide oxalique par litre. Toute eau qui consomme plus de 2 à 3 milligrammes d'oxygène par litre doit être considérée comme suspecte.

2° ***Azote ammoniacal***. — La seule présence de l'ammoniaque dans l'eau est le plus souvent suffisante pour faire rejeter celle-ci de la consommation. On la recherchera donc simplement avec le réactif de Nessler.

Ammoniaque. Réactif de Nessler pour la recherche de l'ammoniaque. — Dissoudre 5 grammes d'iodure de potassium dans 5 grammes d'eau distillée chaude. Ajouter une solution chaude concentrée de bi-

chlorure de mercure jusqu'à ce que le précipité rouge qui se forme cesse de se dissoudre par agitation. Filtrer. Ajouter une solution de 15 grammes d'hydrate de potasse dans 30 grammes d'eau distillée et diluer à 100 centimètres cubes par addition d'eau distillée. Ajouter encore 0 cc. 5 de la solution de bichlorure de mercure. Laisser reposer. Décanter soigneusement et verser le liquide dans un flacon bouché à l'émeri.

Quelques gouttes de ce réactif donnent une coloration jaune ou jaune rougeâtre dans les eaux qui contiennent de l'ammoniaque.

On acidule au moyen de 5 à 6 gouttes d'acide sulfurique par 250 centimètres cubes d'eau à essayer On concentre à environ 30 centimètres cubes en chauffant à l'ébullition dans une fiole à fond plat. On laisse refroidir. Certaines eaux donnent un dépôt cristallisé de sulfate de chaux.

On alcalinise à l'aide de potasse caustique pure : il se forme souvent un précipité de chaux et de magnésie qu'il n'est pas nécessaire de séparer. On ajoute 2 centimètres cubes du réactif de Nessler qui produit un précipité ou une coloration jaune brun d'autant plus foncée qu'il y a une quantité d'ammoniaque plus grande. Dans les eaux calcaires et magnésiennes il se forme un précipité blanc lorsqu'il n'y a pas d'ammoniaque, et coloré par l'entraînement du sel de mercure-ammonium, lorsqu'il y en a.

On fait un témoin dans les mêmes conditions avec de l'eau distillée pure.

Si la réaction est accentuée, on fait le dosage de l'ammoniaque en utilisant les deux solutions titrées suivantes :

Acide sulfurique à 0 gr. 98 de SO^4H^2 par litre. Un centimètre cube correspond à 0 mgr. 98 de SO^4H^2 ou à 0 mgr. 28 d'azote.

Soude à 0 gr. 80 de NaOH par litre, c'est-à-dire équivalente à la solution acide ci-dessus.

L'appareil se compose d'un ballon ou d'une fiole à fond plat de 2 litres, fermé par un bouchon de caoutchouc percé de deux trous ; dans l'un passe la tige d'un entonnoir à robinet ; dans l'autre un tube à dégagement relié à un réfrigérant. On fixe à l'extrémité du réfrigérant un tube à bout effilé. On introduit dans le récipient 1.500 centimètres cubes d'eau et un lait de 10 grammes de magnésie calcinée que

l'on a eu le soin de faire préalablement bouillir. On porte ensuite doucement à l'ébullition, et on distille lentement environ 100 à 150 centimètres cubes. On recueille le liquide distillé dans une fiole conique renfermant 20 centimètres cubes de solution d'acide sulfurique à 0,98 par litre, additionnés de quelques gouttes de solution alcoolique de phénolphtaléine dans laquelle plonge, dès le début, l'extrémité effilée du réfrigérant.

On prépare un témoin avec les mêmes quantités d'eau distillée pure, d'acide et de phénolphtaléine.

On dose, avec la solution de soude à 0. 80 par litre, le témoin et l'épreuve, en prenant la précaution de faire bouillir et refroidir les solutions acides avant le titrage. La différence donne la quantité d'acide sulfurique saturée par l'ammoniaque de l'eau. On en déduit la quantité correspondante d'azote ammoniacal par litre.

3° ***Nitrites.*** — On les recherche par le réactif de Tromsdorff ou par la réaction à la naphtylamine.

a) *Réactif de Tromsdorff*, qui est le plus sensible :

Chlorure de zinc pur.	20 gr.
Iodure de zinc pur.	2 gr.
Amidon soluble.	4 gr.
Eau distillée, q. s. pour	un litre.

Dissoudre d'abord le chlorure de zinc dans 100 centimètres cubes d'eau, y ajouter l'amidon, puis faire bouillir, ajouter l'iodure de zinc, compléter à 1 litre et filtrer sur coton de verre. Conserver dans un flacon en verre brun.

A 10 centimètres cubes d'eau on ajoute 0 cc. 5 de ce réactif et V gouttes d'acide sulfurique. Si l'eau contient des nitrites, on observe très rapidement une coloration bleue plus ou moins intense.

Préparation de l'amidon soluble :

Pour préparer l'amidon soluble ou amylodextrine, on fait macérer pendant 6 à 8 semaines 100 grammes de fécule de pommes de terre dans 600 centimètres cubes d'acide chlorhydrique étendu, de densité 1,06.

Au bout de ce temps les grains qui semblent inaltérés ne se colorent plus en *bleu* par l'iode, mais en *jaune*. On les recueille par centrifugation ou sur un filtre et on les

fait sécher. Après dissolution dans l'eau chaude, ces grains donnent une coloration violette. L'amidon soluble ainsi obtenu peut se conserver sec pendant très longtemps.

b) *Réaction à la naphtylamine.*

On verse dans un tube :

Sol. de naphtylamine B à 1 % filtrée et acidifiée par 10 % d'acide acétique. .	5 cc.
Solution à 1 % d'acide sulfanilique. . .	5 cc.

Coloration rose en présence de traces de nitrites.

4° ***Nitrates.*** — La recherche des nitrates n'offre aucun intérêt au point de vue sanitaire. La présence de ces sels, qui peuvent n'être que les témoins de processus de nitrification très anciens, est fréquente dans les eaux de ruissellement parfaitement filtrées ou dans les eaux souterraines. On peut déterminer leur présence, si c'est utile, par les réactions à la diphénylamine ou à la brucine.

a) *Réaction à la diphénylamine.*

Acide sulfurique pur à 66° Be.	100 cc.
Sol à 5 % de sulfate de diphénylamine. .	5 cc.
Acide chlorhydrique pur à 10 %. . . .	5 cc.

Coloration bleue foncée sur le résidu de l'évaporation dans une capsule de porcelaine.

b) *Réaction de la brucine :*

On délaye le résidu de l'évaporation dans une ou deux gouttes d'acide sulfurique concentré et on ajoute quelques milligrammes de brucine S'il y a des nitrates, il se produit une coloration rouge, virant à l'orangé, puis au jaune.

5° ***Chlore des chlorures.*** — On en effectue le dosage volumétrique avec les deux solutions suivantes, bien exactement titrées :

a) Solution de nitrate d'argent à 2 gr. 9075 par litre. Chaque centimètre cube correspond à 1 milligramme de NaCl ou à 0 mgr. 607 de chlore.

b) Solution de chromate de potassium neutre et pur à 10 p. 100.

On verse dans une fiole conique 250 centimètres cubes de l'eau à analyser, que l'on additionne de 0 cc. 5 de la solution de chromate de potassium. On titre à la burette, au moyen de la solution d'argent, jusqu'au virage du jaune vert au jaune orangé (très délicat, mais très net et sensible pour un œil exercé). On déduit du volume de la solution titrée d'argent ainsi ajouté, le volume de la même liqueur, employé pour obtenir la même teinte dans une solution de chromate jaune de même concentration dans l'eau distillée.

Si l'eau était alcaline, on la rendrait neutre en ajoutant la quantité d'acide sulfurique nécessaire, déterminée par le titrage alcalimétrique.

Si l'eau était très riche en chlorures, on emploierait la solution à 20 gr. 075 de nitrate d'argent, correspondant à 10 milligrammes de NaCl ou 6 mgr. 07 de chlore par centimètre cube.

6° ***Titrages hydrotimétriques***. — Ne sont utiles que pour déterminer la richesse de l'eau en sels calcaires si l'on suppose que ceux-ci, par leur présence en excès, peuvent présenter des inconvénients On détermine alors les degrés hydrotimétriques *avant* et *après* ébullition. C'est ce que l'on appelle le degré hydrotimétrique *total* et le degré hydrotimétrique *permanent*.

Cette détermination s'effectue avec une liqueur titrée de savon qu'on prépare en saponifiant 30 centimètres cubes d'huile d'amandes douces par 10 centimètres cubes de lessive de soude à 36° en présence de 10 centimètres cubes d'alcool à 95°, en chauffant au bain-marie et agitant la masse. Lorsque la réaction est terminée, on complète à 1 litre avec de l'alcool à 60° en remuant constamment. On filtre.

Le titrage de la liqueur s'effectue au moyen d'une solution de chlorure de baryum à 0 gr. 55 de $BaCl^2\ 2H^2O$ par litre.

On mesure exactement 40 centimètres cubes de cette solution, que l'on introduit dans un flacon de 100 centimètres cubes bouchant à l'émeri. On fait tomber la liqueur de savon contenue dans la burette spéciale jusqu'à ce que l'on obtienne par l'agitation une mousse qui doit occuper tout l'espace libre du flacon au début, et persister avec une épaisseur d'un centimètre au moins pendant 4 à 5 minutes, tout en imprimant des mouvements de

rotation à l'eau du flacon. Dans ces conditions, on doit obtenir 22 degrés, sinon on corrige la liqueur titrée de savon. Il est plus simple de noter le titre trouvé et d'en tenir compte dans l'évaluation des degrés hydrotimétriques.

Degré hydrotimétrique total. — On détermine de la manière qui précède le degré hydrotimétrique de l'eau, sans dilution, lorsque le degré ne dépasse pas 25, ou bien sur des fractions de 20 centimètres cubes, 15 centimètres cubes, 10 centimètres cubes, 5 centimètres cubes, de l'eau à essayer, en complétant chaque fois à 40 centimètres cubes avec de l eau distillée fraîchement bouillie, suivant que cette eau accuse un degré de plus en plus élevé. On tient compte, bien entendu, du volume d'eau distillée ajouté.

Degré hydrotimétrique permanent. C'est celui de l'eau après ébullition et séparation du précipité.

100 centimètres cubes de l'eau sont portés à l'ébullition pendant 10 minutes. On refroidit ; on complète à 100 centimètres cubes avec de l'eau distillée bouillie, on agite et on filtre. On prend le degré hydrotimétrique dit *permanent* du liquide filtré.

Un degré hydrotimétrique équivaut, pour un litre d'eau, à :

	Milligr.
Chaux en CaO	5,7
Carbonate de chaux en $CaCO^3$.	10.3
Sulfate de chaux en $CaSO^4$.	14,0
Magnésie en MgO.	3,6
Carbonate de magnésie en $MgCO^3$.	7,6
Sulfate de magnésie en $MgSO^4$.	10,8
Nitrate de chaux (AzO^3) 2Ca.	17,0

Au-dessus de 36° hydrotimétrique (total), l'usage de l'eau devient difficile pour les emplois domestiques.

C. **Analyse microbiologique.**

Elle doit avoir pour objet la numération et la spécification des germes microbiens contenus dans les eaux. C'est elle qui fournit les renseignements les plus utiles sur la valeur hygiénique d'une eau supposée potable, au moment où elle a été recueillie.

Mais, pour que les résultats obtenus soient comparables, il est nécessaire d'employer des méthodes toujours iden-

tiques. Celles indiquées par l'instruction du service de santé militaire du 13 janvier 1909 paraissent encore actuellement les plus recommandables.

Pour la numération des microbes, elles prescrivent l'emploi d'un milieu simple, facile à préparer : la gélatine peptone à l'eau, sans bouillon, composée comme suit :

Gélatine extra (Poulenc frères).	100 gr. en France (180 gr. dans les pays chauds)
Peptone sèche (Poulenc frères).	20 gr.
NaCl.	5 gr.
Eau	1.000 gr.

Neutraliser, puis alcaliniser très faiblement, répartir en tubes par 10 centimètres cubes et stériliser.

On peut également employer un milieu à l'eau de levure autolysée (P. Diénert et A. Guillerd) qui fournit, pour les numérations totales des germes, des résultats équivalents à ceux que donne la gélatine peptonée.

Un kilo de levure de distillerie pressée est mis à sec dans un cristallisoir et porté pendant 24 heures à l'étuve à 50°. Après ce séjour, le bloc de levure s'est résolu en un liquide épais que l'on reprend par l'eau, environ trois litres ; on fait bouillir une 1/2 heure, on neutralise jusqu'à alcalinité légère. On colle la préparation avec un blanc d'œuf, comme pour la préparation de la gélatine ou de la gélose, pour faciliter les filtrations ultérieures qui, sans cette précaution, seraient longues et difficiles. Porter à l'autoclave 1/2 heure à 105°, filtrer sur Chardin, filtrer une deuxième fois, si cela est nécessaire, sur filtre Laurent.

Les filtrations sont rapides et le magma s'essore seul et complètement. On vérifie définitivement la réaction du milieu que l'on ajuste au pH = 7, 5. On complète à 6 litres. Les auteurs appellent cette concentration : dilution normale.

A 10 grammes de peptone du milieu gélatine, peptone, sel, on substitue 100 centimètres cubes de dilution normale d'eau de levure.

On ensemence trois tubes de cette gélatine fondue à 30 degrés avec respectivement, 1, 2 et 3 gouttes de l'eau à analyser (ou, s'il y a lieu, avec 1, 2, 3 gouttes d'une dilution de 1 centimètre cube de cette eau dans 9 centimètres cubes d'eau stérile) et on coule dans des boîtes de

Petri stériles, de 14 centimètres de diamètre. Dès que la gélatine s'est solidifiée, — ce qu'on peut hâter en plaçant les boîtes sur une surface refroidie, on les porte dans une étuve réglée à 18-20° et on les examine tous les jours à partir du 2e jour et ce, pendant 15 jours, pour faire la numération après ce délai, ou dès que le développement des colonies liquéfiantes menace d'envahir une partie du milieu.

Le tableau ci-après représente le coefficient par lequel doit être multiplié le nombre des colonies constatées, si l'on veut évaluer la teneur approximative de l'eau en microbes après 2, 3, 4, etc., jours jusqu'à 15 jours :

	Coefficient.
2 jours	19,6
3 —	8,82
4 —	5,61
5 —	3,86
6 —	3,05
7 —	2,40
8 —	1,82
9 —	1,52
10 —	1,33
11 —	1,19
12 —	1,10
13 —	1,06
14 —	1.04
15 —	1,00

Par exemple, si la numération des colonies a dû être interrompue au 4e jour et si l'on a compté à ce moment 2.000 colonies, le chiffre approximatif des colonies qui se seraient développées dans les cultures est de : 2.000 × 5 61 = 11.220.

Les moisissures sont comptées à part.

La numération des colonies se fait aisément au moyen d'un numérateur à secteur, quadrillé en centimètres carrés, placé sur un fond noir et sur lequel on superpose la plaque à examiner.

On compte successivement les colonies visibles dans un secteur qu'on délimite sur le verre avec un trait de plume, puis celle d'un second secteur et ainsi de suite jusqu'à ce que toutes les colonies développées sur la plaque aient été dénombrées. On en fait le total et celui-ci correspond au nombre de *germes cultivables* en gélatine qui se trouvaient dans la quantité d'eau ensemencée. Par un calcul très simple, on évalue dès lors le nombre de microbes

contenus dans un centimètre cube ou dans un litre de l'eau étudiée.

La *spécification* des germes ne peut se faire avec quelque précision qu'après l'isolement de ceux-ci sur les plaques de gélatine et leur réensemencement sur milieux appropriés.

Toutefois, par l'examen microscopique direct de préparations non colorées et colorées, on peut souvent déterminer les espèces bien connues par leurs caractères morphologiques (cocci, sarcines, spirilles, levures, moisissures, etc.).

On devra mentionner ainsi, dans les rapports d'analyse, certains microorganismes qui proviennent des matières en putréfaction : *Bac. fluorescens liquefaciens, Bac. pyocyanique, Proteus vulgaris, Bac. megaterium, Bac prodigiosus* et les espèces spirillaires qu'il y aura souvent intérêt à isoler par ensemencement dans l'eau gélatinée peptonée, salée (voir vibrions cholériques, chap. XXXV) pour les mieux étudier.

La détermination du bacille typhique, du bacterium coli et des paratyphiques, des bacilles dysentériques, etc., sera faite d'après les méthodes indiquées, pour chacune de ces espèces, aux chapitres XXXIII et XXXIV.

Pour la recherche du *bactérium coli*, l'instruction du service de santé militaire prescrit de l'effectuer, non seulement sur des quantités minimes d'eau (I à XXX gouttes), mais encore sur 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 centimètres cubes et davantage. C'est pourquoi il est nécessaire que les prises d'échantillons portent sur deux flacons de 150 centimètres cubes pour chaque eau à analyser.

On ensemence successivement d'abord I, II, V, XX, XXX gouttes d'eau dans des tubes d'eau peptonée à 1 p. 100, salée à 0, 5 p. 100. On ensemence de même 2 et 10 centimètres cubes dans des ballons contenant 50 et 100 centimètres cubes d'eau peptonée.

Pour les volumes plus considérables, on répartit l'eau (20, 50, 100, 150 centimètres cubes) dans des ballons stériles et on la rend directement nutritive en l'additionnant de proportions variables d'une solution concentrée de pepto-sel :

Peptone sèche Poulenc.	50 gr.
NaCl.	25 gr.
Eau distillée.	100 gr.

Cette solution doit avoir été stérilisée d'avance en tubes fractionnés contenant chacun 5 centimètres cubes. Elle est trouble, mais il est inutile de la filtrer.

A la place d'eau peptonée, on peut se servir d'eau de levure autolysée, selon le procédé de Diénert et Guillerd précédemment indiqué.

On emploie :

Eau de levure (dilution normale).	20 cc
Eau stérile.	30 cc.
Eau d'ensemencement.	50 cc.

L'eau de levure, comme on le voit, est employée au 1/5 pour le B. coli.

En cas d'autolyse défectueuse, qui provient surtout de la température inconstante de l'étuve dans les laboratoires où la pression est variable, on a toujours la latitude d'augmenter la quantité indiquée de levure.

Le mélange d'eau à analyser et de milieu nutritif doit être tel que le taux de peptone qu'il renferme soit égal à 1 p. 100. Par exemple, pour 20 centimètres cubes d'eau, il faut ajouter 0 cc. 4 de solution concentrée ; pour 50 centimètres cubes, 1 centimètre cube. Pour 100 centimètres cubes, 2 centimètres cubes, etc.

La proportion d'acide phénique qu'il convient d'incorporer au mélange d'eau et de solution peptonée est de 0 gr. 85 p. 1.000.

Pratiquement, on obtient un mélange phéniqué conforme en laissant tomber, à l'aide d'une pipette jaugeant 30 gouttes au centimètre cube, *une goutte* de solution phéniquée à 5 p. 100 pour *deux centimètres cubes* du mélange eau à analyser, + eau peptonée; donc, par exemple, 25 gouttes pour 50 centimètres cubes. On agite et on porte à l'étuve à 41°5.

Il ne faut pas ajouter l'acide phénique aux milieux de culture avant de stériliser ceux-ci, car la teneur en acide varierait beaucoup par suite de l'évaporation à l'autoclave.

Les premières cultures faites à 41°5 sont vérifiées 14 à 16 heures après. D'après leurs résultats, on peut déjà conclure, soit à l'absence du bacterium coli dans l'eau expertisée, soit à sa présence dans 1/20, 1/10, 1/5 ou 1 centimètre cube de l'eau, ou bien dans une quantité plus élevée.

(Pour les eaux très souillées, on opère au préalable une

dilution plus ou moins forte de l'eau, afin de fixer leur teneur en b. coli).

Dès qu'un ou plusieurs tubes ou flacons renfermant le mélange phéniqué d'eau à analyser et de solution peptonée s'est troublé, on procède à un second et, au besoin, à un troisième passage en eau peptonée phéniquée à 41°5. Quatre ou cinq heures après, *même si cette deuxième ou troisième culture est encore limpide*, on en fait un prélèvement avec l'extrémité du fil de platine et on identifie le microbe en réensemençant :

en bouillon simple,
en bouillon lactosé carbonaté,
en bouillon au rouge neutre,
en lait tournesolé,

La culture en bouillon simple, qui est elle-même trouble au bout de 4 à 5 heures, sera reportée sur pomme de terre, sur gélose et sur gélatine inclinée.

L'examen microscopique, la non-coloration par le Gram et la recherche de l'indol compléteront les moyens d'identification du bacillus coli.

On peut faire le diagnostic rapide de la souillure des eaux de boisson par le b. coli en employant la technique très simple de *A. Braun*. Celle-ci utilise le milieu de culture de *Savage* que l'on prépare comme suit :

Dans un demi-litre d'eau, on fait cuire 125 grammes de viande de bœuf. Après cuisson et refroidissement, on filtre pour séparer les graisses et on ajoute :

Peptone (Defresne).	10 gr.
Sel	10 gr.
Glucose.	2 gr. 50

On ramène au volume de 500 centimètres cubes avec de l'eau. On fait bouillir de nouveau. On décante après refroidissement, puis on ajoute 5 centimètres cubes de la solution suivante :

Rouge neutre.	5 gr.
Eau	100 cc.

On répartit par fractions de 6 centimètres cubes dans des tubes à essai qu'on stérilise à l'autoclave à 115° pendant 30 minutes.

Le bouillon a une couleur rouge rubis. Le développement du bacterium coli lui donne une belle fluorescence verte ou, s'il est très abondant, jaune canari avec reflets fluorescents, sur fond sombre. Le bacille d'Eberth ne produit aucune modification de la couleur du milieu.

Deux tubes de 6 centimètres cubes de bouillon au rouge neutre ainsi préparé sont ensemencés respectivement avec 1 et 10 centimètres cubes de l'eau à étudier. On porte à l'étuve 24 heures à 37°. Si l'eau ensemencée renferme du b. coli, il se forme des bulles gazeuses à la partie supérieure du bouillon qui devient fluorescent ou jaune canari, suivant l'abondance du coli.

Si la coloration n'a pas viré après 48 heures d'étuve, on peut affirmer que l'eau ne renferme pas de bacillus coli en quantité appréciable.

Quelques autres microbes peuvent déterminer la coloration vert fluorescent, mais pas le jaune canari. Ce sont d'ailleurs des microbes intestinaux : bacillus mesentericus, b. enteritidis Gaertner, bacillus cloacæ, certaines urobactéries ; les bacilles du tétanos et de l'œdème malin, en culture anaérobie, la déterminent aussi.

Cette méthode est sensible et très pratique.

Anaérobies. — La détermination de l'*indice anaérobique*, c'est-à-dire du rapport entre le chiffre des anaérobies vrais et celui des aérobies, est utile à faire, surtout pour les eaux de puits, de citernes, de réservoirs et de rivières.

Le milieu nutritif adopté pour la culture des anaérobies est le suivant :

Gélatine.	100 à 200 gr. (suivant la temp. extérieure).
Glucose	10 gr.
NaCl	5 gr.
Glycérine.	5 gr.
Eau.	1.000 gr.

On neutralise en alcalinisant *très légèrement* et on stérilise en tubes droits, qu'on fait fondre à 30° au moment d'ensemencer et après avoir ajouté à chacun d'eux quelques gouttes de solution stérile de sulfo-indigotate de soude.

Chaque tube contenant 10 ou 20 centimètres cubes de milieu de culture reçoit 0 cc. 1, 0 cc. 2, 0 cc. 5, 1 centimètre cube et 2 centimètres cubes de l'eau à analyser. On

incorpore l'eau au milieu de culture sans trop agiter, pour éviter les bulles d'air, et on aspire le contenu de chaque tube dans de longs tubes-pipettes (pipettes de Vignal) préparés et flambés à l'avance, d'un diamètre intérieur de 3 à 4 millimètres et d'une longueur de 0 m. 50 environ. Ces tubes-pipettes sont ensuite scellés à leurs deux extrémités et portés sous un robinet d'eau froide pour solidifier la gélatine. On les maintient ensuite dans une étuve réglée à 18-20°.

Après 3 à 6 jours, on peut compter les colonies anaérobies qui apparaissent sous forme de petites masses floconneuses ou granuleuses, avec ou sans bulles de gaz, au milieu de la gélatine décolorée.

Les anaérobies facultatifs donnent des colonies ramassées, denses, opaques, qui n'ont pas la physionomie caractéristique des anaérobies vrais. Ils ne doivent pas être compris dans la numération.

*
* *

D. — **Interprétation des résultats d'analyse.**

L'analyse chimique fournit d'utiles indications sur la présence et la proportion de certains éléments qui peuvent résulter de souillures permanentes ou accidentelles, ou qui dépendent de la provenance géologique de l'eau à examiner ; mais l'analyse bactériologique est *indispensable* pour permettre de conclure si une eau est, au point de vue sanitaire, bonne, mauvaise ou suspecte.

La numération des germes contenus dans cette eau fournit surtout d'utiles renseignements pour la surveillance des appareils de filtration et pour savoir si une eau est plus ou moins parfaitement épurée dans son parcours souterrain. Mais certaines eaux de fleuves ou de rivières peuvent véhiculer un grand nombre de germes inoffensifs provenant des couches superficielles du sol, tandis que d'autres eaux, surtout celles de puits ou de sources, se montrent parfois très pauvres en germes saprophytes et abritent cependant certaines espèces microbiennes particulièrement dangereuses.

La spécification des espèces est donc de toute première importance. Les souillures provenant de fumiers, d'infiltrations de fosses d'aisances, etc., sont révélées par

l'abondance des microbes de putréfaction, bacilles liquéfiants, megaterium, proteus, etc., et par la proportion des *bacterium coli*.

Lorsqu'une eau renferme 100, 500, 1.000 bacterium coli par litre et, *a fortiori*, un chiffre plus élevé encore, on doit généralement la considérer comme *très suspecte* et dangereuse pour l'alimentation.

Le taux de 10 à 100 *bacterium coli* par litre indique que l'eau est en période d'infection légère, peut-être au début ou au déclin d'une contamination plus grave. Elle doit être envisagée comme *suspecte*.

La présence de quelques b. coli par litre ne suffira jamais à faire considérer une eau comme dangereuse, car ils peuvent provenir de contaminations accidentelles, par des excréments d'oiseaux par exemple. Mais si ces bacterium coli sont accompagnés de nombreux microbes de putréfaction, la suspicion est alors fondée et il faudra soumettre l'eau à une étroite surveillance.

Du reste, pour juger de la valeur alimentaire d'une eau, il est toujours indispensable de faire porter les analyses sur des échantillons prélevés à des intervalles variables en diverses saisons et en périodes de sécheresse ou de pluies prolongées.

Les diverses échelles qui ont été proposées pour établir la pureté chimique et bactériologique d'une eau potable n'ont donc, d'après ce qui vient d'être dit, qu'une valeur toute relative. Voici néanmoins celle qu'on peut considérer comme la meilleure.

Echelle d'appréciation de la pureté chimique et microbiologique d'une eau potable.

	Nombre de germes cultivables en gélatine en 15 jours (par litre)	Nombre de b. coli par litre	Degré hydrotimétrique total	Chlorures en NaCl. mgr. par litre	Nitrates mgr. par litre
Eau très pure.	0 à 100	0	5 à 15°	max. 27 mgr.	0
Eau potable .	100 à 1.000	1 à 10	15 à 30°	max. 66 mgr	0 à 15
Eau suspecte. .	1 000 à 10 000	10 à 50	+ de 30°	85 à 165 mgr.	15 à 30
Eau mauvaise.	+ de 10.000	+ de 50	+ de 100°	+ de 165 mgr.	+ de 30

E. — Agents chimiques recommandables pour la purification extemporanée des eaux potables.

a) ***Nitrate d'argent et Fluorure d'argent*** (*ou Tachiol*). — 0 gr. 1 de l'un de ces deux sels suffit pour détruire en une demi-heure la plupart des microbes contenus dans 5 litres d'eau de rivière ou d'étang. Le vibrion cholérique est tué en 5 minutes, le bacterium coli et le staphylocoque doré en 30 minutes ; les chlorures et les matières organiques en excès dans l'eau à stériliser retardent l'effet du sel d'argent, mais on peut corriger ce retard en ajoutant préalablement à l'eau quelques gouttes d'ammoniaque (2 à 5 gouttes pour 5 litres) qui dissout le précipité formé par les sels d'argent.

b) ***Iode***. — Ajouter, par litre d'eau, 8 à 16 gouttes de teinture d'iode du Codex. Agiter. Laisser en contact 30 minutes. Neutraliser l'iode restant par infusion de thé, de café ou par addition de vin, ou par l'hyposulfite de soude. (Il se forme dans ce dernier cas une petite quantité de tétrathionate de soude, sel inoffensif.)

c) ***Chlore. Chlorure de chaux***. — Normalement, le chlorure de chaux du commerce doit avoir une teneur en chlore actif de 100 litres ou 321 gr. 5 (le poids d'un litre de chlore est de 3 gr. 125) par kilogramme. 10 grammes de chlorure du commerce suffisent donc pour dégager 1 litre de chlore.

Pour stériliser l'eau potable, il faut, suivant la teneur de celle-ci en matières organiques, de 0 mgr. 3 à 1 milligramme de chlore actif par litre, c'est-à-dire 0 gr. 3 à 1 gramme par mètre cube avec trois heures de contact ; ou bien 4 à 8 milligrammes par litre avec 15 minutes de contact. On peut détruire l'excès de chlore par addition d'une petite quantité de bisulfite de soude.

Pratiquement, on emploiera 1 à 3 grammes de chlorure de chaux du commerce par mètre cube, *avec un contact d'au moins 15 minutes*. En voyage, on peut commodément employer une solution de chlorure de chaux à 1 p. 100,

dont 10 centimètres cubes suffisent pour stériliser en 10 minutes 10 litres d'eau.

d) ***Eau de Javel (hypochlorite de soude).*** — Si l'eau de Javel contient 100 grammes de chlore actif par litre, on en emploiera au plus 10 centimètres cubes par mètre cube ou 0 cc. 01 par litre (1 milligramme de chlore actif), soit 10 litres d'eau de Javel par 1.000 mètres cubes d'eau (1 kilogramme de chlore actif).

Le produit ordinaire du commerce ne renferme habituellement guère plus de 60 grammes de chlore actif par litre, quelquefois beaucoup moins. Il faut alors compter, en moyenne, sur une dépense de 18 litres d'eau de Javel (1 k. 800 de chlore actif) par 1.000 mètres cubes et, pour assurer une stérilisation efficace dans les grands réservoirs d'eau d'alimentation, un contact de 1 à 2 heures (0 cc. 018 pour 1 litre, ou pratiquement 2 centimètres cubes d'une dilution d'eau de Javel à 1 p. 100 pour 1 litre d'eau à stériliser).

e) ***Chlore liquide comprimé.*** — Très employé en Amérique depuis quelques années. On assure son contact suffisamment prolongé avec l'eau dans une sorte de colonne de Gay-Lussac contenant du coke. La dose moyenne nécessaire pour réduire de 98 p. 100 le nombre des microbes de l'eau de rivière est de 0 gr. 2 de chlore par mètre cube, soit 0 milligr. 2 par litre.

f) ***Réactif décelant la présence de traces de chlore libre dans les eaux potables stérilisées par les composés chlorés.***

Solution d'amidon à 1 p. 100.
Solution d'iodure de potassium à 10 p. 100.

Quelques gouttes de ce réactif ajoutées à l'eau stérilisée dans un verre à expériences développent une coloration bleue lorsqu'elle renferme des traces de chlore libre.

*
* *

F. — Désinfection de l'eau des puits.

Après avoir établi le volume d'eau contenu dans le puits,

on y versera environ 10 litres d'eau dans laquelle on aura délayé le mélange suivant (dose par mètre cube) :

Permanganate de chaux.	0 gr. 5 à 1 gr.
ou, à défaut : permanganate de potasse	5 gr.
Sulfate d'alumine.	50 gr.
Kaolin lavé.	145 gr.

Ne pas pomper d'eau pendant 4 jours, puis pomper jusqu'à ce que l'eau devienne incolore.

Ou bien :

Eau de Javel.	50 gr. par mètre cube.

On peut encore, plus simplement, éteindre 10 kilogrammes de chaux vive dans 40 litres d'eau et projeter ce mélange dans le puits, en agitant avec une longue perche. On attend 3 jours et on pompe jusqu'à ce que l'eau sorte claire. La chaux restant dans le puits est inoffensive. Il faut pomper néanmoins jusqu'à ce que toute saveur styptique ait disparu.

Nota : La désinfection des puits ne peut être efficace que si ces puits ont été préalablement curés et débarrassés de boues. Sans cette précaution, elle serait illusoire.

CHAPITRE XIX

ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE L'AIR ET DU SOL

A. — Analyse microbiologique de l'air.

Les deux procédés de choix pour *l'analyse bactériologique de l'air* sont la méthode de Miquel, basée sur l'emploi des bourres solubles, et la méthode de Laveran, basée sur l'emploi du barbotage.

Méthode des bourres solubles de Miquel.

Miquel utilise comme bourre le sulfate de soude desséché. Ce sel est chauffé à 200°. Il se dissout d'abord dans son eau de condensation, puis se solidifie à nouveau et se dessèche. Le sulfate desséché est pilé grossièrement au mortier et tamisé.

On étrangle un tube de verre ouvert aux deux extrémités ; on tasse sur l'étranglement un tampon de coton et on verse au-dessus 1 ou 2 grammes de sulfate, préparé comme il vient d'être dit. Boucher aux deux bouts avec du coton et stériliser à sec.

Pour se servir de l'appareil ainsi préparé, on place le tube verticalement, en ayant soin que le sable soit en haut. On débouche l'extrémité inférieure et on la relie à un aspirateur. On ôte le bouchon de coton qui obture l'extrémité supérieure et on met en marche l'aspirateur. On fait passer un certain nombre de litres d'air, 10 litres habituellement. Lorsque l'opération est terminée, on verse la bourre soluble dans 10 centimètres cubes d'eau stérile et on fait des plaques de gélatine ou de gélose.

Cette méthode est la seule pratique lorsque l'analyse bactériologique ne peut pas être faite sur place.

Méthode de Laveran basée sur l'emploi du barbotage.

L'appareil de Laveran est formé de deux tubes à essai de

grande dimension, verticaux, réunis au niveau de leur tiers supérieur par une branche horizontale. Ils sont obturés par un bouchon de caoutchouc portant une pipette qui plonge au fond. L'un des tubes porte un trait de jauge à 10 centimètres cubes. On y verse 10 centimètres cubes d'eau. Dans l'autre tube, la pipette est graduée en dixièmes de centimètres cubes. On garnit d'ouate les extrémités supérieures des pipettes et on stérilise l'appareil à l'autoclave.

Pour s'en servir, on débouche la pipette graduée et on la relie à un aspirateur. On enlève le coton de l'autre pipette et on fait fonctionner l'aspirateur. L'air passe par la pipette non graduée, barbote dans l'eau et s'échappe par la pipette graduée. Quand 10 litres d'air ont traversé l'appareil, on arrête l'aspirateur, on rince avec l'eau la pipette par laquelle l'air est arrivé et le tube correspondant, puis par la branche horizontale on la fait passer dans le tube qui contient la pipette graduée. Avec cette dernière, on aspire l'eau et on la répartit dans les milieux de culture.

Le nombre de germes est rapporté au mètre cube. Connaissant le volume d'air qui a passé dans l'appareil, la quantité d'eau ensemencée et le nombre de colonies obtenues sur les plaques, il est facile d'en déduire le nombre de germes par mètre cube d'air.

B. — **Analyse bactériologique du sol.**

Pour les prélèvements faits à la surface du sol, recueillir l'échantillon de terre avec une cuiller ou une spatule stérilisées.

Pour les prélèvements à faire en profondeur, se servir d'une sonde à cuiller, pourvue d'une fermeture automatique, telle que la *sonde de Fraenkel.*

Quand l'échantillon de terre aura été recueilli, le broyer finement dans un mortier stérile et le diluer dans une grande quantité d'eau stérile. Agiter fortement et, avec cette émulsion, faire des plaques de gélatine ou de gélose.

Connaissant le poids de terre diluée dans un volume d'eau déterminé, la numération se fait comme pour une analyse d'eau.

G. — Milieux de culture pour les ferments du sol.

FERMENTS NITREUX, NITRIQUES, DÉNITRIFICATEURS ET FIXATEURS DE L'AZOTE ATMOSPHÉRIQUE

a) *Milieux d'Oméliansky pour la culture des ferments nitreux*

Eau distillée	1.000 cc.
Sulfate d'ammoniaque.	2 gr.
Chlorure de sodium.	2 gr.
Phosphate de potasse.	1 gr.
Sulfate de magnésie.	0 gr. 50
Sulfate ferreux.	0 gr. 40

On met 50 centimètres cubes de ce liquide dans un vase d'Erlenmeyer de 250 centimètres cubes, à moitié rempli de scories concassées (Boullanger et L. Massol). On ajoute 0 gr. 5 de carbonate de magnésie sous forme d'un lait stérile et on ensemence avec un peu de délayure de terre de jardin. On fait des passages successifs très nombreux et on élimine ainsi les microbes étrangers. On isole finalement sur plaques de silice gélatineuse.

Pour préparer celle-ci, verser lentement dans 125 centimètres cubes d'acide chlorhydrique à 13° Baumé, un volume égal d'une solution à 8° Baumé de silicate de potasse bien pur. On verse sur un dialyseur en parchemin animal, bien débarrassé de chaux par lavages à l'acide chlorhydrique étendu, puis à l'eau distillée. La dialyse doit se faire dans un courant très lent d'eau distillée, jusqu'à ce que le liquide ne donne plus qu'une réaction imperceptible à l'azotate d'argent.

Après 48 heures de dialyse, on prélève toutes les 3 ou 4 heures un petit échantillon qu'on chauffe à 120° jusqu'à ce qu'on n'observe plus de coagulation. On arrête alors la dialyse, on stérilise à 120°, on répartit en tubes stériles par fractions de 10 centimètres cubes et on ajoute à chaque tube :

Sulfate d'ammoniaque à 4 p. 100. .	0 cc. 5

puis, 0 cc. 5 de :

Sol. de	Chlorure de sodium. . .	4 gr.
	Phosphate de potassium.	2 gr.
	Sulfate de magnésie. . .	1 gr.
	Eau distillée.	100 cc.

puis encore :

0 cc. 5 d'une solution de sulfate ferreux à 0,8 p. 100

et enfin :

Lait de carbonate de magnésie à 10 p. 100, 1 cc. (très léger et bien tamisé).

On coule en boîtes de Petri *après avoir ensemencé* chaque tube avec une gouttelette de ferment nitreux purifié comme il a été dit ci-dessus. La silice fait prise en quinze à quarante-cinq minutes. On maintient les boîtes, dans une cloche humide pour éviter la dessiccation de la silice, à la température de 30° et on voit apparaître, au bout de 8 à 10 jours, de petites colonies réfringentes qu'on repique avec un fil de verre stérile pour les ensemencer dans le milieu d'Omélianskу. Le bouillon de viande ensemencé avec ces colonies doit rester stérile, les ferments nitreux ne s'y développent pas.

Dans le milieu d'Omélianskу, les cultures pures donnent la réaction des nitrites (Tromsdorff, voir chap. XVIII, 3°) du 3e au 5e jour.

b) *Milieu de Winogradsky pour la culture du ferment nitrique.*

(*Nitrobactérie.*) Isoler d'abord par le milieu d'Omélianskу ci-dessus, en remplaçant le sulfate d'ammoniaque par du nitrite de soude, tous les autres sels restant les mêmes ; puis par la silice gélatineuse, dans laquelle on remplace également la solution à 4 p. 100 de sulfate d'ammoniaque par une solution à 4 p. 100 de nitrite de soude. Les colonies sont ensuite ensemencées dans l'un des milieux suivants :

Milieu liquide.	Nitrite de potasse	1 gr.
	Sulfate de magnésie. . . .	0 gr. 3
	Phosphate de potasse. . . .	0 gr. 5
	Carbonate de soude calciné. .	1 gr.
	Chlorure de sodium. . . .	0 gr. 5
	Sulfate de fer.	0 gr. 4
	Eau distillée.	1.000 cc.
Milieu solide.	Nitrite de soude.	2 gr.
	Carbonate de soude.	1 gr.
	Sulfate de magnésie	traces
	Phosphate de potasse. . . .	traces
	Gélose	15 gr.
	Eau du robinet.	1.000 cc.

Ensemencer d'abord des scories stérilisées (en vase d'Erlenmeyer) et mouillées de liquide d'Oméliansky avec un peu d'eau de délayure de terre ou, mieux, avec le produit de lavage d'un fragment de scorie de la surface d'un lit bactérien. On opère ensuite, comme pour les ferments nitreux, l'isolement sur plaques de silice gélatineuse.

Les colonies ne se développent qu'après 2 semaines, sous forme de petits corps ronds ou ovales, brillants, brunâtres à l'air. On peut augmenter leur grosseur en déposant à leur voisinage une goutte de solution à 2 p. 100 de nitrite de soude. Les repiquer et les réensemencer en tubes ou en matras en milieu liquide ou solide.

c) *Milieux de culture pour les ferments dénitrificateurs.*

Liquide de Gayon.	Eau	1.000 cc.
	Nitrate de potasse.	10 gr.
	Acide citrique.	7 gr.
	Asparagine.	5 gr.
	Phosphate de potasse . . .	5 gr.
	Sulfate de magnésie. . . .	5 gr.
	Chlorure de calcium. . . .	0 gr. 5
	Sulfate d'alumine.	0 gr. 02
	Silicate de soude.	0 gr. 02
	Sulfate de fer.	0 gr. 05
	Ammoniaque q. s. pour faible réaction alcaline.	

Répartir en couche épaisse dans des tubes ou des matras et recouvrir le liquide d'une mince couche d'huile de vaseline. Ensemencer avec un peu de fumier de cheval et porter à 35°. La culture se dénonce par un dégagement gazeux abondant. On fait une série de passages dans ce milieu liquide et on isole ensuite sur le même milieu, gélosé à 15 p. 100, en anaérobiose.

d) *Milieux de culture pour les microbes fixateurs de l'azote atmosphérique.*

Milieu de Bredemann *pour Clostridium et Amylobacter.*	Eau.	1.000 cc.
	Asparagine.	10 gr.
	Saccharose.	20 gr.
	Glucose.	16 gr.

Filtrer après dissolution et ajouter :

Phosphate de potasse. . . .	1 gr.
Chlorure de calcium. . . .	0 gr. 1
Sulfate de magnésium. . . .	0 gr. 3
Chlorure de sodium. . . .	0 gr. 1
Perchlorure de fer.	0 gr. 01

Neutraliser par carbonate de soude.

Milieu de Beyerinck pour *Azotobacter*	Eau distillée.	100 cc.
	Mannite.	2 gr.
	Phosphate monopotassique. .	0 gr. 02
	Gélose	1 gr. 5

Ensemencer avec terre de jardin.

Milieu de Zikes pour les algues fixatrices de l'azote, type *chlorella vulgaris*	Phosphate tripotassique. . .	0 gr. 25
	Sulfate de magnésie. . . .	0 gr. 37
	Chlorure de sodium. . . .	0 gr. 20
	Traces de sulfate de calcium et de phosphate de fer. . . .	0 gr. 20

Dans des vases d'Erlenmeyer contenant une mince couche de sable siliceux, on imprègne ce dernier du liquide. On ajoute, suivant les conditions de l'expérience, un peu de sucre avec ou sans nitrates.

e) *Milieux pour la culture des microbes des nodosités des Légumineuses.*

Milieu de Beyerinck (modifié par Mazé).

Infusion de haricots blancs (sans aller jusqu'à la cuisson complète). . . . . 100 gr. p. 1.000 cc.

Filtrer, ajouter :

Chlorure de sodium.	10 gr.
Bicarbonate de soude	traces
Saccharose	20 gr.
Gélose	15 gr.

Répartir en couche mince dans des vases d'Erlenmeyer. Ensemencer avec l'intérieur d'une nodosité. On obtient de petites colonies ressemblant à une goutte de stéarine.

QUATRIÈME PARTIE

RÉACTIONS HUMORALES ET HÉMATIMÉTRIE

CHAPITRE XX

TECHNIQUE POUR LA PRÉPARATION ET LE TITRAGE DES SÉRUMS AGGLUTINANTS, BACTÉRIOLYTIQUES, PRÉCIPITANTS ET HÉMOLYTIQUES.

A. — **Sérum agglutinant et bactériolytique pour le bacille typhique.**

(Pour le titrage des sérums typhiques agglutinants, voir chap. XXXIII et XLV.)

1° *Préparation au moyen des cultures tuées par 1 heure de chauffage à 59°.*

On peut vacciner une chèvre par deux injections intraveineuses chacune de 1 culture en tube incliné, sur gélose, de 24 heures, râclée et émulsionnée dans l'eau physiologique (environ 5 centimètres cubes), puis chauffée en tubes scellés, 1 heure à 58° au bain-marie. Les deux injections sont faites à dix jours d'intervalle.

Pour le lapin, injecter par voie intraveineuse, d'abord environ un cinquantième de culture chauffée à 58°, puis 8 à 10 jours après, un vingtième, puis, 8 ou 10 jours plus tard, un dixième. Saignée 8 jours après la dernière injection.

On peut aussi préparer les lapins par injections sous-cutanées puis intrapéritonéales : 2 injections sous-cutanées, de 1/2 culture d'abord, puis d'une culture sur gélose, râclée, émulsionnée dans l'eau physiologique et chauffée

1 heure à 58°, puis deux injections intrapéritonéales de 1 et 2 cultures sur gélose, respectivement à 10 jours d'intervalle.

Pour les cobayes, injecter 4 fois à 12 jours d'intervalle : 1/4 et 1/2 culture par voie sous-cutanée, 1/4 et 1/2 culture par voie intrapéritonéale.

2° *Au moyen des cultures vivantes.*

On vaccine les cobayes en leur injectant dans le péritoine, d'abord 1/10 de centimètre cube d'une émulsion faite avec une culture sur gélose de 24 heures dans 10 centimètres cubes d'eau salée physiologique ; puis, 8 jours après, et de 8 jours en 8 jours, successivement 2/10, 5/10 et 1/2 centimètre cube d'une émulsion semblable.

*
* *

B. — Sérum antiparatyphique B.

Inoculer le lapin par voie intraveineuse avec 1/10 de centimètre cube d'une culture sur gélose de 20 à 24 heures, râclée et émulsionnée dans 10 centimètres cubes d'eau salée physiologique, puis chauffée 1 heure à 56°.

5 à 7 jours après, on inocule de nouveau, par la même voie intraveineuse, 1/5 de centimètre cube, puis encore, 5 à 7 jours après, 1/2 centimètre cube d'émulsion chauffée.

Pour obtenir un sérum agglutinant et bactériolytique, il faut injecter au lapin, après les cultures tuées par la chaleur, une ou deux fois, par voie péritonéale, des cultures vivantes (1/2 centimètre cube d'une culture émulsionnée dans 10 centimètres cubes d'H^2O physiologique) à 8 jours d'intervalle. On attend dix jours et on saigne l'animal.

Fornet, *Müller* et *Tsuzuki* ont obtenu un sérum agglutinant le *para* B au 30.000ᵉ en soumettant un lapin à 3 séries d'injections intraveineuses de cultures vivantes, réparties comme suit :

Première série :

2 juin.	1/10 culture sur gélose
3 juin.	1/10 » »
4 juin.	1/5 » »

1ʳᵉ saignée le 13 juin. Le sérum agglutine à 1 p. 100.

Deuxième série :

23 juin.	1/5 culture sur gélose
24 juin.	1/2 » »
25 juin.	2/3 » »

2e saignée le 4 juillet. Le sérum agglutine à 1 p. 20 000.

Troisième série :

13 juillet	2/3 culture sur gélose
14 juillet	1 » »
15 juillet	2 » »

3e saignée le 24 juillet. Le sérum agglutine à 1 p. 30.000.

*
* *

C. — Sérum antiparatyphique A.

Même méthode que pour le *Paratyphique B,* mais en employant d'emblée les cultures vivantes.

*
* *

D. — Sérum agglutinant les bacilles dysentériques.

Lapins : Injection intraveineuse, à 5 ou 6 jours d'intervalle, de cultures vivantes, soit du bacille *Shiga,* soit du bacille *Flexner,* pour obtenir un sérum spécifique *anti-Shiga* ou *anti-Flexner.*

Répéter les injections au moins 6 fois. Dose initiale : 1/100 de centimètre cube d'une émulsion d'une culture sur gélose de 24 heures dans 10 centimètres cubes d'eau salée physiologique. Doses ultérieures : 1/50 de centimètre cube, 1/20, 1/10 et 1/5 de centimètre cube. Saigner 10 jours après la dernière injection.

E. Sérum agglutinant et bactériolytique anti-choléra.

Lapins : Injecter une première fois dans les veines 1/100 de centimètre cube d'une émulsion de culture sur gélose âgée de 24 heures dans 10 centimètres cubes d'eau physiologique, chauffée 1 heure à 56.

Renouveler l'injection tous les 7 jours avec, successive-

ment : 1/50 cc., 1/10 de centimètre cube, puis, dans le péritoine, 1/2 et 1 centimètre cube.

Saigner de 7 à 10 jours après la dernière injection.

D'après *Fornet* et *Müller*, on peut obtenir en 13 jours un sérum anti-choléra agglutinant au 10.000e en inoculant, par voie intraveineuse au lapin, le 1er jour, 2/3 de culture sur gélose, le 2e jour, 1 culture, et le 3e jour, 1 culture et demie. On saigne l'animal le 10e jour après la dernière injection.

*
* *

F. — Sérums précipitants.

On injecte par voie veineuse ou intrapéritonéale, par kilogramme d'animal, environ 1 centimètre cube du liquide antigène. On renouvelle l'injection tous les 5 à 6 jours. Après 3 ou 4 injections, on attend 8 jours et on saigne.

Fornet et *Müller* ont indiqué une méthode encore plus rapide. Elle consiste à injecter, par voie péritonéale, 5 centimètres cubes du sérum ou de la solution albumineuse antigène, puis, le jour suivant, 10 centimètres cubes, et le jour suivant encore 15 centimètres cubes. On attend 12 jours et on saigne.

Mesure du pouvoir précipitant. — La mesure du pouvoir précipitant d'un sérum *anti* s'effectue, soit vis-à-vis d'une dilution de microbes (de titre connu et légèrement opalescente), soit vis-à-vis d'une dilution d'antigène albumineux quelconque, de la manière suivante :

On répartit dans une série de tubes à essai stériles, de préférence dans des tubes de petit diamètre à fond rond (0 cent. 5 × 10 cent.), la même quantité (1 centimètre cube) d'émulsion microbienne ou albumineuse bien homogène. A chacun de ces tubes, — sauf dans le premier qui sert de témoin, — on ajoute une quantité variable et progressivement croissante, par exemple 0 cc. 1, 0 cc. 2, 0 cc. 3... 1 cc. du sérum actif pur ou du même sérum préalablement dilué à 1/10, ou à 1/100 (s'il est très actif), dans l'eau salée physiologique. On porte les tubes à l'étuve à 37° et on les observe après 2 heures, 6 heures, 12 heures et 24 heures. On note chaque fois les tubes dans lesquels la clarification du liquide est complète.

G. — Propriétés bactéricides et bactériolytiques des sérums. Leur détermination et leur mesure.

Les propriétés bactéricides et bactériolytiques d'un sérum d'animal vacciné, ou naturellement immun, sont dues à la présence, dans ce sérum, d'une sensibilisatrice spécifique dont l'action vient s'ajouter à celle de l'alexine normale.

Lorsqu'on se propose de *rechercher* ou de *mesurer* le pouvoir bactéricide ou le pouvoir bactériolytique d'un sérum, on doit se servir de ce sérum *préalablement chauffé 30 minutes à 58°* en tube scellé. On le dilue généralement au dixième dans l'eau salée physiologique. Supposons qu'il s'agisse de mesurer le pouvoir bactéricide *in vitro* d'un sérum de convalescent typhique, par exemple, vis-à-vis du bacille typhique.

On doit disposer d'une culture de ce bacille, sur gélose inclinée, et âgée de 24 heures. On introduit un centimètre cube d'eau salée physiologique dans le tube qui renferme cette culture dans laquelle le poids des bacilles (essorés) correspond à environ 0 gr. 10 et on délaye celle-ci avec soin au moyen d'un fil de platine. On transvase ensuite, au moyen d'une pipette stérile, ce centimètre cube d'émulsion à 1/10 dans un autre tube à essai contenant 9 centimètres cubes d'eau salée physiologique stérile. On agite avec soin et on transvase, avec une autre pipette stérile, 1 centimètre cube de cette première dilution dans un second tube contenant également 9 centimètres cubes d'eau salée physiologique stérile. On agite de nouveau, et c'est sur cette dilution au millième de la culture sur gélose que portera l'expérience.

Celle-ci doit être conduite de la manière suivante :

Dans une série de tubes à essai stériles, bouchés à l'ouate et contenant chacun *1 centimètre cube d'eau salée physiologique stérile*, on verse une même dose de dilution de culture, par exemple *un dixième* de centimètre cube, ou *2 gouttes* de la dilution au millième, préparée comme il a été dit ci-dessus. On introduit ensuite, dans chacun de ces tubes, une même quantité de sérum frais de cobaye (alexine), généralement *un dixième de centimètre cube* ou *2 gouttes*, puis

(sauf dans le premier tube qui sert de témoin) une quantité progressivement croissante de la dilution au dixième du sérum à étudier, par exemple 0 cc. 1, 0 cc. 2, 0 cc. 5, 0 cc. 8 et 1 centimètre cube. On complète partout avec de l'eau physiologique pour que le volume soit de 2 centimètres cubes ou 2 cc. 5 dans tous les tubes ; on agite légèrement et on porte à l'étuve à 37°, ou mieux dans un bain-marie à température constante, également à 37°.

Après des temps variables, de 1 heure, 2 heures ou plus, généralement 3 heures (avec le bacille typhique 5 heures), on fait, dans chaque tube, un prélèvement à la pipette et on laisse tomber une goutte de chaque échantillon au centre d'une boîte de Roux d'un tube plat de Legroux contenant de la gélose nutritive solide. Cette goutte est immédiatement étalée sur toute la surface de la gélose au moyen d'un petit carré de papier glacé stérile tenu entre les mors d'une pince flambée. (On doit avoir plusieurs de ces petits carrés de papier, préparés d'avance, dans un flacon à large ouverture, bouché à l'ouate et stérilisé à l'autoclave.)

Les boîtes de Roux, de Pétri ou les tubes de Legroux, ainsi ensemencés chacun avec une goutte de dilution de culture, ayant subi, pendant des temps variables, le contact du sérum, sont laissés à l'étuve à 37° pendant 24 ou 48 heures, après quoi on les examine et on compte les colonies de bacille typhique qui se sont développées sur chaque tube ou boîte. Il ne reste plus qu'à établir la proportion du nombre de ces colonies par rapport au volume de dilution microbienne ensemencé et au temps de contact de cette dilution avec le sérum.

Le pouvoir *bactériolytique* peut, dans certains cas, être observé directement sous le microscope. On fait alors deux préparations : l'une avec du sérum normal ; l'autre avec le sérum frais non chauffé ou avec du sérum chauffé activé par addition d'alexine fraîche de cobaye. Au centre de deux lames, on dépose une gouttelette de dilution de culture et, à côté de celle-ci, une gouttelette de sérum actif. On recouvre d'une lamelle ; les deux gouttelettes se mélangent. On porte les lames à l'étuve pendant 5 ou 10 minutes et on les examine comparativement l'une après l'autre.

Avec le bacille typhique, et aussi avec plusieurs autres microbes pathogènes, la détermination et la mesure du

pouvoir bactéricide d'un sérum anti peut être faite *in vivo*. On effectue alors, dans des tubes à essai stériles, des mélanges d'une quantité fixe de dilution microbienne avec des proportions variables du sérum actif. On laisse en contact, à l'étuve à 37°, pendant un temps fixe, — par exemple 3 heures, — et on inocule 1 centimètre cube de chacun de ces mélanges sous la peau ou dans le péritoine d'une série d'animaux sensibles, de même poids.

*
* *

H. — Titrage du pouvoir bactéricide des sérums antimicrobiens.

(Techniques de Jouan et Staub, M. Nicolle, Frasey, Debains et Nicolas.)

Premier procédé. — On cultive les germes sur gélose, pendant 6 heures à 37°. On les émulsionne dans l'eau physiologique additionnée de bouillon Martin au vingtième, à raison de 1 centigramme de microbes pour 20 centimètres cubes de liquide. On fait alors, en partant de cette première émulsion, une dilution telle qu'elle contienne de 400 à 1.500 germes vivants par 1/20 de centimètre cube. Pour cela on étend d'abord au quart la première émulsion avec l'eau physiologique + bouillon Martin et on porte ensuite 1/20 de centimètre cube de la seconde dilution ainsi obtenue dans 100 centimètres cubes d'eau physiologique + bouillon Martin. On répartit en tubes d'après le schéma suivant :

1° *Emulsions telles quelles*,

Pour ensemencement immédiat ;

Pour ensemencement après 2 heures à 37°.

2° *Emulsions + sérum frais de cobaye (alexine)* :

Selon les cas 0 cc. 01, 0 cc. 02, 0 cc. 05, 0 cc. 1.

3° *Emulsions + sérum frais de cobaye + sérum normal non chauffé*,

0,01, 0,001, 0,0001, 0,00001, 0,000001.

On fait autant de séries qu'on a choisi de doses d'alexine.

4° *Emulsions + sérum frais de cobaye + sérum anti, non chauffé* :

0,01, 0,001, 0,0001, 0,00001, 0,000001, 0,0000001, 0,00000001, 0,000000001.

On fait autant de séries qu'on a choisi de doses d'alexine. Bien agiter. Ensemencer 1/20 de centimètre cube de la première des émulsions telles quelles. Porter les autres pendant 2 heures à 37°, agiter ensuite et ensemencer 1/20 de centimètre cube de chaque tube dans un tube de gélose Martin fondue, que l'on coule en boîte. La répartition homogène des germes est assurée par agitation de la gélose dans la boîte. Après 24 heures, on lit à la loupe. Si le nombre des colonies ne dépasse pas la centaine, on les compte individuellement. Lorsqu'elles sont plus nombreuses, on pratique la numération de plusieurs centimètres carrés, au moyen d'un carton perforé. On fait la moyenne et on multiplie par la valeur de la surface, évaluée également en centimètres carrés.

Deuxième procédé. — Dans cette méthode, on se propose d'opérer sur un nombre de germes constant. Pour maintenir ce nombre invariable, il convient d'opérer à la température de 44° qui arrête tout développement microbien, et de faire usage de bouillon Martin régénéré par l'ébullition, milieu qui empêche la diminution numérique des bactéries.

On cultive les germes pendant 6 à 24 heures à 37° sur gélose Martin. On les émulsionne dans le bouillon Martin préalablement bouilli pendant un quart d'heure, puis refroidi, à raison de 1 centigramme par 20 centimètres cubes de liquide, etc., comme plus haut, mais on opère à 44°. On ajoute immédiatement le sérum, normal ou anti, et le complément après une demi-heure. On ensemence après une heure, sauf la première des émulsions.

La dose d'alexine est considérée comme bonne lorsque la quantité de germes obtenue après 24 heures avec le premier procédé, ou une heure avec le second, dans les émulsions additionnées de sérum de cobaye, représente au moins le tiers de celle que contiennent les émulsions témoins, après le même temps.

Un sérum normal ou anti est considéré comme bactéricide lorsque la quantité de germes obtenue en fin d'expérience avec les émulsions additionnées d'alexine et de sérum représente au plus le cinquième de celle que contiennent, après le même temps, les émulsions témoins additionnées d'une dose identique d'alexine.

CHAPITRE XXI

SÉRUMS HÉMOLYTIQUES. — TITRAGE DE L'ALEXINE, DES ANTIGÈNES ET DES ANTICORPS

A. Sérums hémolytiques.

1° ***Préparation.*** — On inocule 4 ou 5 fois à 6 jours d'intervalle, sous la peau, à un lapin par exemple, 2 ou 3 centimètres cubes d'hématies de mouton ou de chèvre, préalablement lavées au moins dans trois eaux physiologiques successives. Pour faire ce lavage, on centrifuge le sang défibriné initial ; on décante le sérum, on remplace celui-ci par H^2O physiologique ; on met les hématies en suspension, on centrifuge de nouveau, on décante et ainsi de suite.

Le sérum obtenu par saignée (8 jours après la dernière injection d'hématies) d'un animal ainsi traité est inactivé par chauffage une demi-heure à 55°.

2° ***Titrage.*** — Dans une série de 10 tubes à essai, on introduit, au moyen d'une pipette graduée, 1 centimètre cube d'émulsion au vingtième d'hématies lavées de mouton ou de chèvre [1] et ensuite, dans chaque tube, des quantités variables de sérum hémolytique préalablement dilué au 1/100, soit par exemple 0 cc. 1, 0 cc. 2, 0 cc. 3, etc., jusqu'à 1 centimètre cube.

Puis on introduit dans tous les tubes, sauf dans le dernier, une quantité fixe d'alexine : deux doses minima d'alexine préalablement titrée avec un sérum étalon.

On égalise dans tous les tubes (2,5 centimètres cubes) par addition d'eau salée physiologique et on porte à l'étuve à 37° pendant une demi-heure.

1. On peut stabiliser les hématies de mammifères et les conserver pendant au moins deux semaines à la température du laboratoire en les mettant en suspension dans de l'eau physiologique additionnée de 2 p. 1.000 de formol (*Armand-Delille* et *Launoy*).

Après ce délai, on note à partir de quel taux de sérum hémolytique l'hémolyse est totale.

Pour les réactions de *Wassermann* ou les titrages d'anticorps et d'alexine, on utilisera toujours, comme *dose normale de sérum hémolytique, une dose égale à 10 fois la dose minima* hémolytique.

Le sérum hémolytique chauffé sera réparti en flacons ou en ampoules, et conservé à la glacière. Il garde pendant très longtemps le même pouvoir hémolytique. Il n'est donc pas nécessaire de le titrer avant chaque série d'expériences, mais seulement chaque mois environ.

On peut obtenir plus rapidement des sérums hémolytiques lapin anti-chèvre ou anti-mouton par exemple, en inoculant au lapin, par voie intraveineuse, 3 à 5 centimètres cubes d'émulsion d'hématies de chèvre ou de mouton lavées, puis, 6 à 8 jours après, *encore par voie intraveineuse*, la même dose, et enfin, 6 à 8 jours après, 5 centimètres cubes de la même émulsion, cette fois *par voie péritonéale*. On attend 8 jours et on saigne l'animal.

H. Sachs injecte deux fois, à 8 jours d'intervalle, 30 centimètres cubes de sang défibriné et lavé dans le péritoine. 9 à 10 jours après la seconde injection l'animal peut être saigné.

Pour préparer à la fois de grosses quantités de sérum hémolytique, on a recours, dans les grands laboratoires, au cheval, qu'on charge avec des globules de mouton. Il est nécessaire de pratiquer 5 à 7 injections sous-cutanées de 10 à 15 centimètres cubes de globules, tous les 6 jours environ.

On saigne le cheval 8 jours après la dernière injection. Pour avoir la plus grande quantité possible de sérum sans recharger le cheval, on peut lui faire une première saignée de 6 litres, puis deux saignées de 4 litres à 4 jours d'intervalle. Les sérums des deux premières saignées présentent à peu près le même pouvoir hémolytique. Celui de la troisième saignée est légèrement inférieur.

*
* *

B. Titrage de l'alexine.

On dispose d'un sérum hémolytique inactivé de puissance hémolytique exactement connue.

L'alexine est fournie par le sérum frais de cobaye. Nous avons déjà indiqué comment on pouvait se le procurer.

L'activité de cette alexine doit être titrée avant chaque réaction, car sa valeur varie d'un cobaye à l'autre. Par cette opération, on détermine la dose minima, variable avec chaque alexine, qui permettra de déceler les plus faibles traces d'anticorps ou d'hémolysine.

Pour titrer l'alexine, on fait une dilution au 1/15 du sérum de cobaye dans de l'eau salée physiologique à 8,5 de sel marin p. 1.000. On introduit, dans une série de tubes, 0 cc. 05, 0 cc. 1, 0 cc. 2, jusqu'à 0 cc. 5 de cette dilution. On ramène, dans chaque tube, le volume total à 2 cc. 5 en complétant avec de l'eau salée physiologique. On agite chaque tube pour assurer le mélange et on porte les supports à l'étuve pendant 1 heure[1].

On ajoute alors partout 10 doses minima de sensibilisatrice hémolytique et une goutte de l'émulsion de globules. Au bout d'une demi-heure de séjour à l'étuve à 37° on lit les résultats. La dose d'alexine fixée est indiquée par le premier tube de la série où l'on constate l'hémolyse. On prend cette dose comme dose minima dans les expériences de fixation.

Si on conserve une provision d'alexine pendant plusieurs jours à la glacière, il est indispensable de recommencer le titrage de cette alexine avant chaque opération.

*
* *

C. Titrage des antigènes.

Tout antigène doit être titré au point de vue de son *pouvoir anticomplémentaire* et au point de vue de sa *valeur antigène*.

a) ***Titrage du pouvoir anticomplémentaire*** (*absorbant ou empêchant*). — Avant de pratiquer toute réaction de déviation, il faut déterminer la dose à laquelle l'antigène fixe à lui seul la quantité d'alexine employée pour produire l'hémolyse.

1. Il est nécessaire de procéder ainsi, *Calmette, Massol et Grysez ayant montré que l'alexine diluée, conservée à l'étuve pendant une heure* (temps exigé pour la fixation du complexe : anticorps-alexine, dans la réaction de déviation du complément), *perd environ la moitié de son activité.*

Pour opérer ce titrage, on dilue l'antigène (extrait ou émulsion concentrée de microbes) avec des quantités croissantes d'eau physiologique : 1/5, 1/10, 1/20, 1/30. 1/40, 1/50, etc. On prend une quantité fixe de chacune de ces dilutions, soit 1 centimètre cube, qu'on met en présence de doses croissantes d'alexine à partir de la dose minima. On complète au volume total de 2 cc. 5 avec de l'eau salée physiologique et, après avoir agité les tubes, on les porte à l'étuve à 37° et on les y laisse une heure. Au bout de ce temps de contact, on ajoute le système hémolytique : 1 goutte d'émulsion de globules et 10 doses minima de sensibilisatrice hémolytique. On agite chaque tube et on reporte les supports à l'étuve à 37°. Après un séjour d'une demi-heure, on les retire et on lit les résultats.

On prend, pour effectuer les réactions de déviation, la dilution d'antigène qui n'a pas exercé de pouvoir empêchant à partir de la dose minima d'alexine.

Les extraits (alcooliques, glycériniques, etc.) peuvent être titrés une fois pour toutes au point de vue de leur pouvoir empêchant. Cependant, il est prudent de recommencer le titrage de temps en temps, car, pour les extraits alcooliques, le pouvoir empêchant peut légèrement augmenter après un certain délai de conservation.

b) ***Titrage de la valeur d'un antigène.*** — Pour mesurer la valeur d'un antigène, il faut disposer d'un sérum type dont on connaît la richesse en anticorps. De deux antigènes, le meilleur sera celui qui permettra de déceler la plus grande quantité d'anticorps dans un sérum donné. Le titrage de la valeur d'un antigène peut se faire par deux méthodes différentes :

1° En faisant croître les doses d'alexine en présence d'une dose fixe d antigène ;

2° En faisant décroître les quantités d'antigène en présence d une dose fixe d'alexine.

1° *Dose fixe d'antigène, doses croissantes d'alexine.* — Pour ne pas être obligé d'employer de trop grosses quantités d'alexine, il est prudent de prendre une dilution d'antigène assez étendue, sans quoi on risquerait de ne pas arriver à la limite du pouvoir déviant de l'antigène.

On fait agir une quantité fixe de la dilution de l'antigène,

par exemple 1 centimètre cube de la dilution au 1/100, et une quantité fixe, par exemple 0 cc. 5 d'un sérum connu chauffé 30 minutes à 56°, en présence de doses croissantes d'alexine à partir de la dose minima. Des tubes témoins reçoivent séparément l'antigène seul et le sérum seul avec les mêmes doses d'alexine. On complète partout au volume total de 2 cc. 5 avec de l'eau salée physiologique ; on place les tubes à l'étuve à 37° pendant une heure. On les en retire pour ajouter le système hémolytique ; on les replace à l'étuve pendant une demi-heure, puis on lit les résultats.

La valeur de l'antigène s'apprécie par le rapport :

$$\frac{N}{V} = \frac{\text{nombre de doses d'alexine déviées.}}{\text{volume de l'antigène employé.}}$$

Si 0 cc. 01 d'antigène a dévié 8 doses minima d'alexine, l'unité de volume de cet antigène dévie 800 unités d'alexine.

Si le système hémolytique reste constant, la valeur d'un antigène, déterminée en présence d'un sérum type, reste constante.

2° *Doses décroissantes d'antigène ; doses fixes d'alexine.* — Dans une série de 10 tubes, on introduit des doses variables, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1 centimètre cube de la dilution d'antigène dont on veut déterminer la valeur. Chaque tube reçoit ensuite la même dose d'un sérum à anticorps, inactivé par un chauffage de 30 minutes à 56°, et la même dose d'alexine de cobaye, préalablement titrée, soit *deux doses minima.* On fait des tubes témoins avec la dose fixe de sérum et avec les doses décroissantes d'antigène employées, puis on procède comme il a été dit plus haut.

*
* *

D. Titrage des anticorps ou sensibilisatrices dans un sérum anti.

(Technique de Calmette et Massol.)

A. Une première série de trois tubes reçoivent chacun une dose fixe d'antigène titré (par exemple 1 centimètre cube de dilution au 1/20 d'antigène tuberculeux).

B. Une deuxième série de trois tubes reçoivent chacun 0 cc. 5 du sérum à anticorps à étudier.

C. Une troisième série comprend cinq tubes au moins. Chacun reçoit la dose d'antigène de la série *A*, *plus* la dose de sérum à anticorps (0 cc. 5) de la série *B*.

Dans chacun des tubes des trois séries on ajoute des doses d'alexine allant en croissant de tube en tube en prenant pour dose initiale la dose minima permettant l'hémolyse du complexe hématies *plus* sérum hémolytique inactivé (10 doses minima de ce dernier) ; par exemple 0 cc 01, 0 cc. 02, 0 cc. 03,..... 0 cc. 05.

On complète partout au volume de 2 cc. 5 avec H^2O physiologique à 8 gr. 5 de NaCl p 1.000, en ayant soin de faire tourner les tubes entre les doigts, de manière à entraîner toute l'alexine dont une partie aurait pu rester adhérente à la paroi du verre.

Le support contenant ainsi les trois séries de tubes est porté à l'étuve à 37° pendant une heure, puis on ajoute, dans chaque tube, une goutte de l'émulsion d'hématies lavées de mouton et ensuite une dose de sérum hémolytique inactivé anti-mouton représentant 10 fois la dose minima hémolytique (par exemple 0 cc. 1 d'un sérum dont 0 cc. 01 est la dose minima hémolytique en présence d'un excès d'alexine).

On reporte à l'étuve à 37° pendant une demi-heure. On lit alors les résultats.

La réaction de fixation est *positive*, — donc démontrant la présence d'anticorps, — si l'alexine déviée par le mélange antigène *plus* sérum à étudier (série C) est supérieure aux volumes d'alexine déviés respectivement par l'antigène et par l'anticorps (séries A et B).

Si un volume V du sérum étudié dévie N doses minima d'alexine, le rapport $\frac{N}{V}$ représente le nombre de doses minima d'alexine que peut dévier 1 centimètre cube de sérum anti.

CHAPITRE XXII

RÉACTION DE BORDET-WASSERMANN ET PRÉPARATION DES ANTIGÈNES SYPHILITIQUES.

A. **Préparation de l'antigène syphilitique.**

a) *Extrait alcoolique de foie de nouveau-nés syphilitiques.* — On triture soigneusement au hache-viande d'abord, puis au broyeur Latapie [1], des fragments de foie. On étale cette pulpe en couche mince dans des cuvettes en verre ou en porcelaine préalablement stérilisées par flambage rapide, et on les porte dans la cloche à vide sulfurique pour les dessécher dans le plus bref délai possible.

On récolte la pulpe sèche qu'on réduit en poudre par broyage au mortier. Cette poudre est traitée par l'alcool absolu à raison de 10 grammes de poudre pour 100 grammes d'alcool.

On laisse macérer au moins 24 heures dans un flacon bouché qu'on agite de temps en temps, puis on filtre. On obtient ainsi une solution mère qu'on répartit en flacons et qu'on peut conserver pendant très longtemps.

Pour s'en servir, on l'étend d'eau physiologique dans la proportion de 1 partie de solution mère pour 3 ou 4 parties d'eau salée. Il faut, en général, 0 cc. 2 à 0 cc. 25 de cette dilution pour chaque réaction, mais on doit s'assurer, par un titrage préalable (voir chapitre XXI, pouvoir fixateur des antigènes), que cette dose ne fixe pas une trop grande quantité d'alexine. Si c'est nécessaire, on dilue davantage la solution mère.

b) *Extrait alcoolique de cœur de veau. Méthode de Bordet et Ruelens.* — Ces auteurs traitent d'abord le cœur de veau par l'acétone, rejettent ce premier extrait et épuisent ensuite

1. Chez Cogit, 36, boulevard Saint-Michel, à Paris.

le même organe par de l'alcool ; ce second extrait est utilisé pour les sérodiagnostics.

On commence par hacher le tissu musculaire cardiaque, en prenant soin de ne pas en exprimer le suc. On ajoute 125 centimètres cubes d'alcool à 95° à 100 grammes de cœur haché, et on agite. Cet alcool, ajouté en proportion relativement faible, n'a pas de pouvoir dissolvant sensible sur les lipoïdes ; il coagule les albuminoïdes. Après quelques jours de contact à la température ordinaire, on jette le tout sur un filtre. Après égouttage, on enlève du filtre, le tissu ; on l'étale sur un cristallisoir qu'on porte à l'étuve à 37° pendant un jour : le tissu, coagulé et antiseptisé par l'alcool, se dessèche très vite sans subir aucune altération. Le tissu sec est mis dans un flacon dans lequel on introduit 200 centimètres cubes d'acétone ; il y séjourne environ une semaine à une température de 18 à 20°. On élimine alors l'acétone, on laisse égoutter, on ajoute encore un peu d'acétone, on maintient encore un jour dans ce réactif qui, rinçant le tissu, enlève les dernières traces des substances solubles. On jette de nouveau sur un filtre ; le tissu égoutté est débarrassé complètement de l'acétone par un séjour de quelques heures à l'étuve, puis transporté en flacon dans lequel on verse 200 centimètres cubes d'alcool à 95°. On maintient pendant 8 à 10 jours à la température de 20° environ. Le liquide ainsi obtenu, filtré, est l'antigène. Il a une teinte jaune d'or.

Au moment de l'emploi, cet antigène doit être émulsionné dans de l'eau physiologique, à une dilution qui sera déterminée par le titrage ; elle varie entre le 1/20 et le 1/40.

Avoir soin d'ajouter l'eau physiologique à l'extrait alcoolique, d'abord goutte à goutte en agitant constamment, puis, plus rapidement, quand le précipité louche apparaît, en agitant toujours le mélange.

Le liquide n'a aucun pouvoir anticomplémentaire. Cet antigène est considérablement plus actif que l'extrait alcoolique total.

c) *Extrait alcoolique de cœur humain additionné de cholestérine*. — On peut aussi, selon le procédé de *Walker* et *Swift*, préparer un antigène avec du cœur humain additionné de cholestérine, en opérant de la manière suivante :

Le cœur, soigneusement débarrassé de graisse, est découpé

en minces fragments, pesé et immergé dans de l'alcool absolu. La proportion doit être de 1 gramme de tissu cardiaque pour 10 centimètres cubes d'alcool. On laisse macérer pendant deux semaines à 37°, dans un bocal bouché à l'émeri qu'on agite plusieurs fois chaque jour. Après ce délai, on sort le bocal de l'étuve jusqu'à refroidissement à la température du laboratoire et on filtre sur papier Berzélius. On ajoute ensuite au liquide une quantité de cholestérine pure correspondant à 0 gr. 4 pour 100 centimètres cubes d'extrait alcoolique.

Cet extrait s'emploie dilué au dixième dans l'eau salée physiologique à 9 gr. 50 de NaCl par litre, à la dose de 0 cc. 25 pour chaque réaction.

*
* *

B. Technique de Calmette et Massol pour la réaction de Bordet-Wassermann.

La réaction de Bordet-Wassermann, pratiquée selon la technique de Calmette et Massol, nécessite la préparation et le titrage des divers éléments suivants : hématies lavées, sérum hémolytique, alexine de cobaye et antigène (au point de vue de son pouvoir anticomplémentaire et de son pouvoir antigène). Pour ces diverses opérations, se reporter aux techniques précédemment indiquées.

Pour avoir 4 ou 5 centimètres cubes de sérum, il faut prélever 10 à 12 centimètres cubes de sang. On chauffe le sérum à 56° pendant 30 minutes pour l'inactiver. Il est inutile de chauffer le liquide céphalo-rachidien, à moins qu'il ne contienne du sang. Si on dispose d'une quantité de sérum suffisante, il y a avantage à employer 0 cc. 5 de sérum par tube pour compenser les altérations du sérum qui peuvent être causées par le chauffage, sinon on prend 0 cc. 3 ou 0 cc. 2.

Comme nous l'avons déjà vu, le principe de la méthode consiste à mettre une dose fixe de sérum à étudier, accompagnée d'une dose fixe d'antigène syphilitique, en présence de quantités croissantes d'alexine, ainsi que les témoins sérum et antigène disposés séparément.

La réaction se fait de la manière suivante :

Le sérum inactivé à étudier ou le liquide céphalo-rachi-

Réaction de Bordet-Wassermann par la technique de Calmette et Massol.

	TUBES.	1				11	
		Sérum chauffé	Antigène syphilitique	Alexine diluée au 1/15. Dose minima 0,1	Eau physiologique	Emulsion de globules	Sérum hémolytique 10 doses minima
	1	0,5 cc.	0,5 cc	0,1 cc.	1,4 cc.	1 goutte.	0,1 cc.
	2	0,5 »	0,5 »	0,2 »	1,3 »	1 »	0.1 »
	3	0,5 »	0,5 »	0,3 »	1,2 »	1 »	0,1 »
	4	0 5 »	0 5 »	0,4 »	1,1 »	1 »	0,1 »
	5	0,5 »	0 5 »	0,5 »	1 »	1 »	0,1 »
Tém. sérum	S_1	0,5 »		0,1 »	1,9 »	1 »	0,1 »
	S_2	0,5 »		0,2 »	1,8 »	1 »	0,1 »
	S_3	0.5 »		0,3 »	1,7 »	1 »	0 1 »
Tém. antigène	A_1		0,5 »	0,1 »	1.9 »	1 »	0,1 »
	A_2		0,5 »	0.2 »	1,8 »	1 »	0,1 »
	A_3		0,5 »	0,3 »	1,7 »	1 »	0,1 »

DILUTION GLOBULAIRE FRAICHEMENT FAITE OU AGITÉE



Intacte.
Liquide opaque.



Hémolysée.
Liquide laqué transparent.

DILUTION GLOBULAIRE APRÈS SÉDIMENTATION OU CENTRIFUGATION



Hémolyse nulle.
éviation complète.
+++

Hémolyse légère.
Déviation partielle.
++



Hémolyse incomplète.
Déviation légère.
+



Hémolyse totale.
Déviation nulle.
—

Planche extraite de : Armand-Delille et Nègre.
Technique de la réaction de déviation du complément.

dien à la dose constante de 0 cc. 5 et l'antigène à la dose constante de 0 cc. 5 de la dilution, déterminée par le titrage préalable, sont mis en présence de 0 cc. 1, 0 cc. 2, 0 cc. 3, 0 cc. 4, 0 cc. 5 d'alexine diluée, 0 cc. 1 étant la dose minima. On fait trois tubes témoins sérum et trois tubes témoins antigène avec 0,1, 0,2 et 0,3 d'alexine. On complète dans chaque tube, avec de l'eau salée physiologique, au volume total de 2 cc. 5. On agite chaque tube et on porte à l'étuve à 37° pendant une heure.

On ajoute ensuite le système hémolytique (1 goutte de globules et 10 doses de sensibilisatrice hémolytique) et on porte à l'étuve à 37° pendant une demi-heure.

La lecture des résultats est faite à ce moment. Elle indique le nombre d'unités d'alexine déviées séparément par le sérum et par l'antigène d'une part (tubes témoins) et par le mélange sérum-antigène d'autre part ; en cas de réaction positive, elle donne le nombre d'unités d'alexine déviées.

La quantité d'anticorps contenus dans le sérum s'exprime par le rapport $\frac{N}{V}$ qui, comme nous l'avons dit, représente le nombre de dose minima d'alexine que peut dévier 1 centimètre cube de sérum anti.

*
* *

C. — Technique de l'Institut Pasteur par le procédé rapide, Hecht, Levaditi, Latapie, remanié par Weinberg et Mutermilch.

I. ***Réactifs.*** — 1° *Antigène de Bordet et Ruelens.* — Cet antigène, avant son emploi, doit être émulsionné dans de l'eau physiologique dans des proportions variant de 1/20 à 1/40. Toutefois, avant de mettre un nouvel antigène en circulation, il est préférable de le soumettre à un titrage et à une comparaison avec un ancien antigène déjà éprouvé.

Titrage de l'antigène. — Doit être fait comme il a été indiqué. Un bon antigène ne doit pas posséder de propriétés anticomplémentaires à des solutions concentrées ; il doit être suffisamment sensible pour fixer l'alexine en présence des sérums syphilitiques, même quand il est très dilué.

Pour préparer une émulsion de l'antigène dans de l'eau

physiologique, il faut ajouter de l'eau à l'antigène (et non l'antigène à l'eau), d'abord très lentement, par gouttes, en agitant constamment l'émulsion. Quand la quantité d'eau ajoutée a déjà atteint 2 à 3 fois le volume de l'antigène, on peut continuer avec moins de précaution, un peu plus rapidement, mais en agitant toujours le mélange.

2° Les sérums humains soumis à l'examen seront employés à l'état actif.

3° Employer une émulsion à 5%, dans l'eau physiologique, de globules de mouton lavés.

II. ***Réaction de fixation de l'alexine.*** — Six tubes à hémolyse sont nécessaires pour chaque réaction : la série des trois premiers tubes servira pour la réaction de fixation ; celle des trois autres tubes, qu'on disposera de préférence derrière la première série, servira pour la détermination de l'index hémolytique.

Les deux premiers tubes de la première série reçoivent respectivement 0 cc. 1 et 0 cc. 2 d'antigène, 0 cc. 2 et 0 cc. 1 d'eau physiologique et 0 cc. 1 de sérum à examiner ; le troisième tube qui sert de témoin, reçoit 0 cc. 1 de sérum humain et 0 cc. 3 d'eau salée, chacun des trois tubes de la seconde série, qui servira pour la détermination de l'index hémolytique, reçoit tout d'abord 0 cc. 1 de sérum à examiner, puis on ajoute à chaque tube respectivement 0 cc. 3, 0 cc. 6 et 0 cc. 9 de globules de mouton à 5% ; le tout est agité et mis à l'étuve à 37° pendant une heure et demie. On ajoutera ensuite aux trois tubes de la première série des quantités de globules de mouton variables selon que l'index hémolytique est fort ou faible : en effet, si 0 cc. 1 de sérum humain n'hémolyse que 0 cc. 3 de globules de mouton au maximum, on ajoutera, à la fin de la réaction, à chacun des trois premiers tubes, 0 cc. 1 de sang de mouton ; si 0 cc. 1 de sérum humain est capable d'hémolyser 0 cc. 6 de globules, c'est-à-dire si l'index hémolytique du sérum est égal à 6, on ajoutera 0 cc. 2 de globules de mouton ; si enfin l'index hémolytique est égal à 9, on ajoutera toujours un tiers du maximum, c'est-à-dire 0,3 d'émulsion globulaire.

Si l'index hémolytique du sérum soumis à l'examen est égal à zéro, cela signifie que ce sérum ne renferme pas d'alexine normale (cas le plus fréquent), ou de sensibi-

lisatrice anti-mouton, ou enfin ces deux substances à la fois.

Dans ce cas, on est obligé de recourir aux méthodes basées sur la réaction classique de Bordet-Wassermann (méthode Calmette et Massol) où l'on se sert d'alexine de cobaye et de sensibilisatrice anti-mouton. On peut aussi employer l'alexine et l'hémolysine normales contenues dans un sérum humain négatif, frais.

Réaction de fixation de l'alexine par le procédé dit rapide.

Eau physiologique	Antigène	Sérum à examiner	Globules de mouton à 5 %
0 2	0,1	0,1	0,1 ou 0,2 ou 0,3
0,1	0,2	0,1	0.1 ou 0,2 ou 0,3
0,3		0,1	0.1 ou 0 2 ou 0,3
1 h 1/2 à 37°			selon que l'index hémolytique est égal à 0,3-0,6 ou à 0.7 30' à 40' à 37°.

Tableau d'une détermination de l'index hémolytique.

Sérum à examiner	Globules de mouton à 5 %
0,1	0,3
0,1	0,6
0,1	0,9

CHAPITRE XXIII

RECHERCHE ET TITRAGE DES ANTICORPS TUBERCULEUX

A. — Préparation des antigènes tuberculeux.

a) *Extrait peptoné B² de Calmette et Massol.* — On fait macérer, pendant 48 heures, au bain-marie à 65°, 5 grammes de bacilles secs, préalablement lavés, dans 100 centimètres cubes d'une solution de peptone de Witte à 10 p. 100 dans l'eau distillée (la teneur en peptone de la tuberculine brute de Koch est de 10 p. 100). On sépare ensuite le liquide des microbes par filtration, et on le répartit en flacons ou en ampoules.

Cet antigène est un véritable extrait de bacilles de Koch, dépourvu des substances complexes inactives ou empêchantes que renferme la tuberculine. Il décèle les moindres quantités d'anticorps contenues dans les divers sérums de sujets tuberculeux.

Pour l'emploi, on le dilue au 1/10 dans l'eau physiologique et on ajoute, à chaque tube de réaction, 1 centimètre cube de cette dilution.

b) *Antigène à l'œuf de Besredka.* — La culture en profondeur du bacille tuberculeux, dans un milieu liquide à l'œuf, a permis à Besredka de préparer un antigène doué d'une grande sensibilité. On emploie, à cet effet, une culture de quatre jours de bacilles tuberculeux humains dans le bouillon à l'œuf réparti à raison de 50 centimètres cubes par boîte de Roux. Après stérilisation par un chauffage de trente minutes à 100°, on laisse pendant vingt quatre heures les bacilles se déposer au fond de la boîte, puis on décante et on centrifuge le dépôt ; le culot ainsi obtenu est dilué dans 4 centimètres cubes d'eau physiologique. La suspension microbienne est ensuite soumise, au moins pendant deux heures, à une agi-

tation mécanique dans un tube de verre muni de billes de verre. Finalement, elle est diluée dans trente fois son volume d'eau physiologique à 9 p. 1.000.

D'après Urbain, la partie active de l'antigène à l'œuf récemment préparé avec une culture de quatre jours, est constituée par les corps microbiens émulsionnés. Au contraire, dans une émulsion ancienne, c'est le liquide séparé par centrifugation qui est devenu très actif, comme nous l'avons constaté. Les bacilles tuberculeux, remis en émulsion dans l'eau physiologique, ne dévient plus que très faiblement l'alexine. L'antigène de Besredka préparé depuis 2 ou 3 mois se comporte donc comme un extrait bacillaire. Sa sensibilité se conserverait intacte pendant au minimum 15 mois.

c) *Antigène méthylique de Boquet et Nègre.* — Des bacilles humains et bovins, provenant de cultures sur bouillon glycériné, âgées de 6 semaines, sont stérilisés par un chauffage de trente minutes à 120°, filtrés sur papier et mélangés à parties égales. Les corps bacillaires sont ensuite lavés à l'eau distillée sur le filtre, puis desséchés à l'étuve ou dans la cloche à vide.

Les microbes secs sont traités par de l'acétone pendant 24 heures (1 centimètre cube d'acétone par centigramme de bacilles), desséchés de nouveau et, finalement, mis à macérer dans l'alcool méthylique à 99° (1 centimètre cube d'alcool par centigramme de bacilles) [1].

On laisse en contact pendant dix à douze jours à 37°-38°, en agitant fréquemment. Le liquide, séparé du dépôt microbien par filtration, constitue l'antigène tuberculeux qui doit être employé à la dose d'un vingtième de centimètre cube, soit 1 centimètre cube de la dilution au vingtième dans l'eau physiologique. Le pouvoir anticomplémentaire de cette dilution est à peu près équivalent à celui de l'antigène de Besredka. Comme pour ce dernier, il disparaît en présence du sérum normal.

Les extraits méthyliques doivent être conservés à l'abri de la lumière et de l'air, à cause de leur pouvoir hygroscopique. Ils fournissent, à froid, un précipité assez abondant qui se

1. Il est indispensable d'employer de l'alcool méthylique à 99°, l'action dissolvante des alcools à titre plus faible étant presque nulle.

dépose sous la forme de petites masses blanches, et se redissout entièrement lorsque le liquide est porté à 45°-50°.

Au moment de l'emploi, l'antigène méthylique, rendu limpide par un séjour de quelques minutes à l'étuve ou au bain-marie à 50°, est prélevé avec une pipette sèche et versé dans un verre sec. Il est additionné, d'abord goutte à goutte, puis plus rapidement, d'eau physiologique, dans les proportions indiquées. L'émulsion doit être trouble et opalescente. Pour éviter les échecs, il est indispensable de se conformer à cette technique.

Les extraits ainsi préparés ont une activité plus grande que les extraits méthyliques directs tels que Petrof les avait réalisés. Leur sensibilité est équivalente à celle de l'*extrait peptoné de Calmette et Massol* et de l'*antigène à l'œuf de Besredka*. Ils fournissent une réaction positive avec les sérums des tuberculeux, même en présence de très faibles quantités d'anticorps. Ils offrent l'avantage d'une préparation facile et d'une conservation indéfinie. On peut se les procurer à l'Institut Pasteur.

*
* *

B. — Technique de Calmette et Massol pour la recherche des anticorps tuberculeux.

La méthode de Calmette et Massol, appliquée au *titrage des anticorps tuberculeux dans le sérum des malades*, comporte trois séries de tubes : la première, de 5 tubes ou davantage, reçoit une quantité fixe, soit 0 cc. 2 du sérum à éprouver, inactivé par chauffage pendant 1/2 heure à 55° et une quantité fixe de l'antigène méthylique, soit 1 centimètre cube de la dilution au 1/20 ; la 2e série de trois tubes (témoins sérum) reçoit la même quantité de sérum que les tubes de la 1re série, soit 0 cc. 2. La 3e série de 3 tubes (témoins antigène) reçoit la même quantité d'antigène que les tubes de la 1re série, soit 1 centimètre cube.

Dans chaque tube des trois séries, on ajoute ensuite des doses croissantes d'alexine à partir de la dose minima.

On complète partout au volume total de 2 cc. 5 avec de l'eau salée physiologique à 8,5 p. 1.000 et on agite soigneusement chaque tube pour assurer l'homogénéité du mélange.

Technique de Calmette et Massol pour la recherche des anticorps tuberculeux.

	TUBES	Sérum chauffé	Antigène méthylique dilué au 1/20	Alexine diluée au 1/15. Dose minima, 0,1	Eau physiologique	Emulsion de globules	Sérum hémolytique 10 doses minima
	1	0.2 cmc.	1 cmc.	0,1 cmc.	1 2 cc.	1 goutte.	0.1 cmc
	2	0,2 »	1 »	0,2 »	1,1 »	1 »	0,1 »
	3	0,2 »	1 »	0,3 »	1 »	1 »	0,1 »
	4	0,2 »	1 »	0,4 »	0,9 »	1 »	0,1 »
	5	0,2 »	1 »	0 5 »	0 8 »	1 »	0,1 »
Tém. sérum	S_1	0 2 »		0,1 »	2,2 »	1 »	0 1 »
	S_2	0.2 »		0,2 »	2,1 »	1 »	0,1 »
	S_3	0,2 »		0,3 »	2 »	1 »	0,1 »
Tém. antigène	A_1		1 »	0 1 »	1,4 »	1 »	0,1 »
	A_2		1 »	0.2 »	1,3 »	1 »	0.1 »
	A_3		1 »	0,3 »	1,2 »	1 »	0,1 »

Les supports contenant les trois séries de tubes sont placés à l'étuve à 37° pendant une heure, puis on ajoute, dans chaque tube, une goutte d'émulsion d'hématies lavées et une quantité de sérum hémolytique, représentant 10 fois la dose minima active. Les tubes sont de nouveau agités, reportés à l'étuve à 37° et examinés au bout d'une demi-heure.

Le pouvoir anticomplémentaire de l'antigène méthylique est pratiquement négligeable, puisqu'il disparaît sous la seule action du sérum normal chauffé (sérums négatifs). Il n'y a donc pas lieu d'en tenir compte. Les seuls sérums considérés comme positifs sont ceux qui fixent nettement une quantité d'alexine supérieure à la quantité d'alexine déviée dans les tubes témoins ne contenant que du sérum.

Si un volume V du sérum à étudier dévie N doses minima d'alexine, le rapport $\frac{N}{V}$ exprime le nombre de doses d'alexine fixées par l'unité de volume du sérum, en l'espèce le centimètre cube : soit, par exemple, un sérum fixant 3 doses minima, le rapport $\frac{N}{V} = \frac{3}{0,5} = 6$ représente le nombre de doses minima d'alexine fixées par 1 cc. de sérum.

Les divers sérums, titrés avec un même antigène et un même système hémolytique, peuvent être ainsi comparés entre eux d'après le nombre d'unités d'alexine qu'ils dévient.

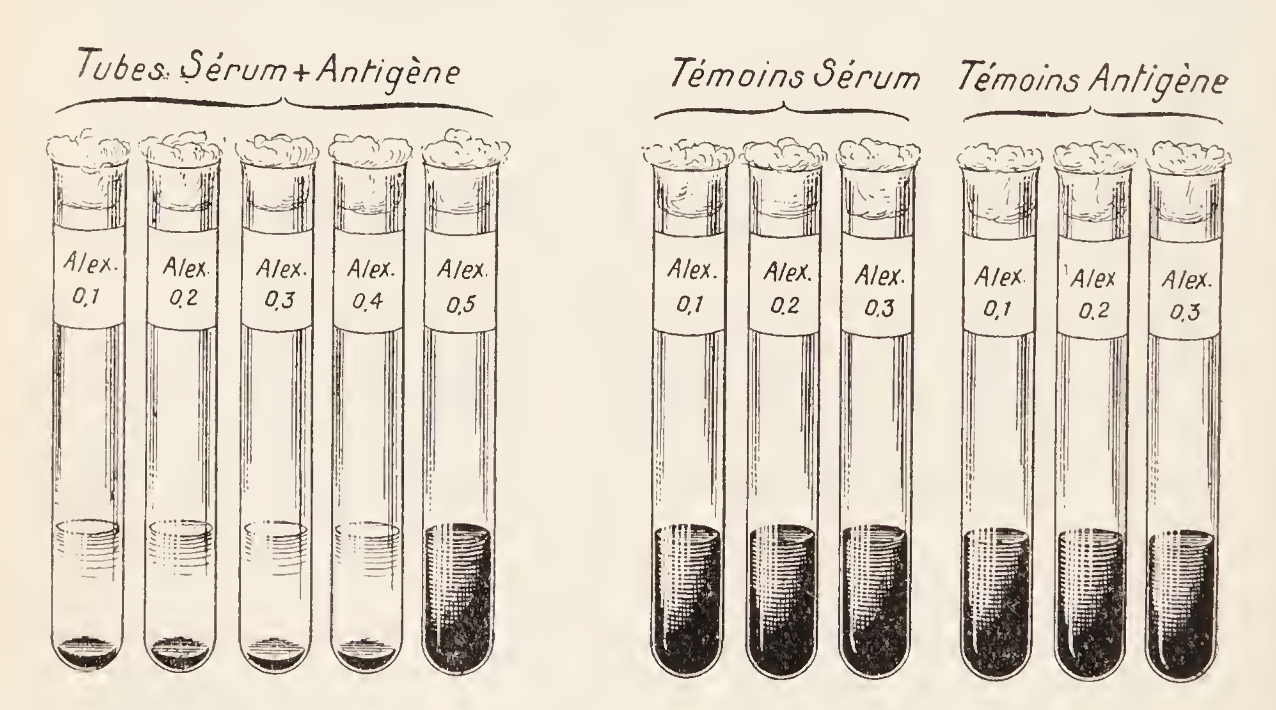


Fig. 7. — Dispositif pour la réaction de déviation du complément par la méthode de Calmette et Massol. Le mélange Sérum + Antigène a dévié 4 doses minima d'alexine. Tous les tubes témoins sont hémolysés.

CHAPITRE XXIV

SÉRO-RÉACTION DE L'ÉCHINOCOCCOSE

On emploie comme antigène le liquide de kyste hydatique recueilli aseptiquement. On utilise de préférence des kystes du foie ou des poumons de bœuf ou de mouton que l'on peut se procurer facilement dans les abattoirs.

On prélève aseptiquement le liquide hydatique par ponction du kyste, en stérilisant la paroi au moyen d'un fer porté au rouge. Le liquide est réparti en tubes scellés qui sont conservés à la glacière. Il peut servir pendant plusieurs années, tant qu'il conserve sa limpidité. Les tubes souillés se troublent, dégagent une mauvaise odeur et doivent être rejetés.

Les extraits alcooliques ou éthérés de liquide hydatique, moins constants que les liquides purs, doivent être abandonnés. Mais comme les liquides hydatiques ont un pouvoir antigène très variable, il est indispensable d'en faire un titrage préalable en présence d'un sérum connu pour ne conserver que ceux qui se sont montrés les plus actifs.

Les liquides hydatiques d'origine animale ne sont jamais spontanément empêchants au-dessous de la dose de 0 cc. 8. Il faut donc toujours se tenir au-dessous de cette dose.

Au contraire, les liquides d'origine humaine ne peuvent être employés que dans des limites très restreintes, en raison de l'écart minime entre leur pouvoir anticomplémentaire propre (à la dose de 0 cc. 1) et leur pouvoir fixateur spécifique (à la dose de 0 cc. 05).

Méthode de Weinberg.

Weinberg recommande de faire toujours parallèlement la réaction avec le sérum à éprouver *non chauffé* et *chauffé*. Il a montré que par le chauffage à 56° le sérum perd une partie de ses anticorps : la moitié et même les deux tiers.

Sérum non chauffé.

On utilise deux doses d'antigène, 0 cc. 1 et 0 cc. 2, en présence d'une dose fixe de sérum, 0 cc. 1. Un troisième tube de sérum sert de témoin.

a) *Méthode de Weinberg au sérum non chauffé.*

Tubes	I : 1 heure à l'étuve à 37.			II : 30 minutes d'étuve à 37°	
	Sérum non chauffé	Antigène	Eau physiologique	Globules de mouton à 5 p. 100	
1 1'	0,1 cc.	0,1 cc.	0.2 cc.	dans 1 : 0,1 cc.	dans 1' : 0,2 cc
2 2'	0,1 »	0,2 »	0,1 »	» 2 : 0,1 »	» 2' : 0.2 »
T.S T'S'	0,1 »		0,3 »	» T. S : 0,1 »	» T' S' : 0,2 »

On fait, avec le même sérum, 2 rangées de 3 tubes, car on interprète les résultats d'après la force hémolytique des sérums

On ajoute, à la fin du contact d'une heure à l'étuve à 37°, 0 cc. 1 de globules dilués à 5 p. 100 dans la 1re rangée et 0 cc. 2 dans la 2e rangée.

En même temps, on détermine l'index hémolytique du sérum à éprouver, c'est-à-dire sa teneur en sensibilisatrice hémolytique naturelle, de la façon suivante :

Index hémolytique du sérum.

Tubes	Sérum à éprouver	Globules de mouton à 5 p. 100	Eau physiologique
1	0,1 cc.	0,1 cc.	cc.
2	0,1 »	0,2 »	0 9 »
3	0,1 »	0,3 »	0,8 »
4	0,1 »	0.4 »	0,7 »
5	0,1 »	0.5 »	0,6 »
6	0,1 »	0,6 »	0,5 »
7	0,1 »	0,7 »	0,4 »
8	0,1 »	0 8 »	0,3 »
9	0,1 »	0,9 »	0,2 »
10	0,1 »	1,0 »	0,1 »

On lit les résultats après 1 heure d'étuve à 37°. Si la teneur du sérum en hémolysine est faible, c'est-à-dire si 0 cc. 1 de sérum hémolyse une quantité de globules inférieure à 0 cc. 5, on ne tient compte que des résultats donnés par la 1re rangée de tubes (0 cc. 1 de globules).

Si la teneur du sérum en hémolysine est élevée, c'est-à-dire si 0 cc. 1 de sérum est capable d'hémolyser 0 cc. 5 et plus de globules, on néglige les résultats donnés par la 1re rangée (0 cc. 1 de globules) et on lit les résultats donnés par la 2e rangée (0 cc. 2 de globules).

b) *Méthode de Weinberg au sérum chauffé.*

Dans cette méthode qui complète la précédente, on emploie une dose fixe : 0 cc. 3 de sérum à éprouver, chauffé 30 minutes à 56, et une dose fixe d'alexine diluée de moitié : 0 cc. 1 en présence de doses croissantes d'antigène, 0 cc. 2, 0 cc. 3, 0 cc. 4.

Tubes	I : 1 heure étuve à 37°				II : 30 minutes étuve à 37°
	Sérum à éprouver, chauffé	Antigène hydatique	Alexine diluée à 1/2	Eau physiologique	Globules dilués à 5 % sensibilisés
1	0,3 cc.	0,2 cc.	0,1 cc.	1,4 cc.	1 cc.
2	0,3 »	0,3 »	0,1 »	1,3 »	1 »
3	0,3 »	0,4 »	0,1 »	1,2 »	1 »
Témoin sérum .	0,3 »		0,1 »	1,6 »	1 »
Témoin ant. A		0,4 »	0,1 »	1,5 »	1 »
A 2		0,6 »	0,1 »	1,3 »	1 »
A 3		0,8 »	0,1 »	1,1 »	1 »
Témoin alexine.			0,1 »	1,9 »	1 »

On double les doses d'antigène : 0 cc. 4, 0 cc. 6, 0 cc. 8, pour les tubes témoins antigène, afin d'être certain d'éliminer le pouvoir anticomplémentaire.

On emploie un système hémolytique constitué par des globules de mouton et un sérum hémolytique lapin-mouton. On sensibilise les globules préalablement en ajoutant, à la dilution de globules au 1/20, la quantité de sérum hémolytique suffisante pour produire une hémolyse rapide et on complète avec la quantité d'alexine indiquée.

Les réactions positives faibles avec le sérum chauffé ne sont à retenir que si on a obtenu une réaction franchement positive avec le sérum non chauffé.

Si les résultats des deux réactions sont complètement opposés, il vaut mieux conclure dans le sens négatif, à moins qu'on n'ait des résultats différents avec un autre antigène.

CHAPITRE XXV

RÉACTIONS DE FLOCULATION POUR LE DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS

A. — **Méthode de Sachs et Georgi.**

Ces auteurs utilisent comme antigène un extrait de cœur de bœuf cholestériné. On peut aussi employer le cœur de cobaye ou du foie syphilitique.

L'antigène peut être préparé de la façon suivante :

a) 1 gramme de cœur frais + 5 centimètres cubes d'alcool ;

b) 100 centimètres cubes d'extrait + 200 centimètres cubes d'alcool ;

c) 13 cc. 5 de cholestérine à 1 %.

b et *c* varient suivant les échantillons.

Technique. — 1 centimètre cube de la dilution au 1/10, dans l'eau physiologique, du sérum chauffé 30 minutes à 56° est mis en présence de 0 cc. 5 d'antigène dilué 6 fois

Tubes témoins : sérum positif, sérum négatif, antigène + eau.

Les tubes sont laissés 2 heures à 37° et 18-20 heures à la température de la chambre, ou 18-20 heures à l'étuve.

La floculation est observée à l'agglutinoscope de Kuhn et Woithe et appréciée suivant les degrés : + + + ; + + ; + ; ± ; —.

*
* *

B. — **Méthode de Dreyer et Ward** (*Réaction Sigma*).

Ces auteurs ont publié en 1921 une méthode de séro-réaction pour le diagnostic de la syphilis qui est basée

comme celle de Sachs et Georgi, sur la floculation. Leur but a été d'établir une méthode simple n'exigeant ni alexine ni système hémolytique, pouvant s'effectuer toujours dans les mêmes conditions, et permettant d'apprécier la quantité d'anticorps et de l'exprimer en unités par centimètre cube. Ils ont, depuis lors, légèrement modifié leur technique en prolongeant le séjour des tubes au bain-marie, mais le principe de la méthode n'a pas changé.

Antigène. — L'antigène employé par les auteurs est un extrait cholestériné de cœur de veau mis en suspension dans l'eau physiologique, à deux concentrations différentes.

a) L'extrait alcoolique de cœur de veau est préparé suivant la méthode de *Bordet* et *Ruelens* :

100 grammes de cœur de veau, dépouillé de sa graisse, sont coupés en petits morceaux et mis en contact avec 125 centimètres cubes d'alcool ordinaire à 94, 96 p. 100.

Ce mélange est abandonné pendant cinq jours à la température du laboratoire. L'alcool est alors filtré. Le résidu est desséché à 37° pendant 24 heures. On ajoute 200 centimètres cubes d'acétone pur et le mélange est laissé pendant sept jours à 20°. L'acétone est alors filtré et le résidu est de nouveau traité par 100 centimètres cubes d'acétone pendant une journée. On filtre pour se débarrasser de l'acétone. Le résidu est desséché à 20° pendant deux heures. On ajoute 200 centimètres cubes d'alcool à 96°. Le mélange est laissé à 20° pendant dix jours, puis filtré sur papier. Le filtrat ainsi préparé, limpide et jaune d'or, est prêt à être employé. Il contient les substances du cœur de veau, insolubles dans l'acétone, solubles dans l'alcool.

Conservé à l'abri de la lumière et à la température du laboratoire, en flacon bouché à l'émeri, il reste limpide pendant longtemps.

b) La solution alcoolique de cholestérine est préparée en dissolvant 1 gramme de cholestérine pure dans 100 centimètres cubes d'alcool absolu.

c) La solution d'eau physiologique est préparée en dissolvant 9 grammes de chlorure de sodium dans un litre d'eau

distillée, récemment préparée et stérilisée immédiatement à l'autoclave.

Les auteurs utilisent comme antigène deux suspensions en eau physiologique, à des concentrations différentes, de cet extrait de cœur cholestériné, préparées de la façon suivante :

A 5 centimètres cubes d'extrait alcoolique de cœur de veau, ajouter dans un verre bien sec, 0 cc. 25 de solution cholestérinée. Pour la suspension *a*, prendre 1 centimètre cube de ce mélange et 10 centimètres cubes d'eau physiologique ; pour la suspension *b* : 1 centimètre cube de ce mélange et 34 centimètres cubes d'eau physiologique.

Les auteurs attachent, avec juste raison, une très grande importance à la façon dont le mélange (extrait alcoolique-cholestérine) est incorporé à l'eau physiologique. Ils ont construit un appareil à siphon qui permet de faire couler goutte à goutte l'eau physiologique dans le cylindre de verre qui contient le centimètre cube d'extrait alcoolique de cœur de veau cholestériné. Pour avoir des résultats toujours comparables, l'eau physiologique doit tomber dans le récipient d'une hauteur de 36 centimètres dans un temps constant. Pour la suspension *a*, les 10 centimètres cubes d'eau physiologique doivent s'écouler en 1 minute 25 secondes ; pour la suspension *b*, les 34 centimètres cubes d'eau physiologique doivent s'écouler en 4 minutes 30 secondes.

Sérum. — Les sérums à éprouver sont chauffés à 55° au bain-marie pendant une heure et demie.

Dispositif de la réaction. — Les auteurs utilisent 9 tubes sérums + antigène et 2 tubes témoins antigènes. Les quantités de sérum et d'antigène sont mesurées à l'aide d'une pipette compte-gouttes à tétine de *Dreyer*. Dans le tableau ci-dessous, les quantités respectives de sérum, d'antigène et d'eau physiologique qui entrent dans la réaction sont exprimées en gouttes :

Numéros des tubes	Gouttes d'eau physiologique	Gouttes de sérum	Gouttes de suspension d'antigène	Dilution finale à laquelle agit le sérum
1	0	20 pur	6 suspension *a*	1/ 1,25
2	0	10 »	15 suspension *b*.	1/ 2,5
3	5	5 »	15 —	1/ 5 2
4	8	2 »	15 -	1/13,1
5	9	1 »	15 —	1/26 4
6	0	10 dil. 1/20	15 —	1/46
7	5	5 »	15 —	1/92
8	8	2 »	15 —	1/232
9	9	1 »	15 —	1/462

Le tube témoin antigène *a* contient 20 gouttes d'eau physiologique et 6 gouttes de la suspension *a*.

Le tube témoin antigène *b* contient 10 gouttes d'eau physiologique et 15 gouttes de la suspension *b*.

Après chaque réactif, la pipette est lavée à l'eau distillée et séchée soit avec l'acétone, soit avec l'alcool suivi de l'éther.

Les portoirs contenant les tubes sont placés au bain-marie à 37° où ils doivent séjourner pendant 20-22 heures. Les deux tiers de la colonne de liquide des tubes doivent être immergés dans l'eau. Après ce séjour de 20-22 heures au bain-marie à 37°, les tubes sont laissés une dizaine de minutes à la température du laboratoire. On procède alors à la lecture en disposant un écran sombre derrière les tubes.

Expression des résultats en unités. — Les termes employés par les auteurs pour exprimer les différents degrés de floculation sont :

Floculation totale ;

Standard-floculation ;

Trace de floculation et floculation nulle.

Dans la floculation totale, le liquide est devenu clair. De gros floculats tombent au fond du tube. Dans la floculation standard, la floculation peut être constatée à l'œil nu. Les petits floculats sont régulièrement distribués dans la masse du liquide, tous de même dimension et bien séparés les uns des autres. Quand il y a trace de floculation, les floculats sont très fins et ne peuvent être aperçus qu'à la loupe. Pour

exprimer les degrés de floculation entre ces quatre termes, on peut leur accoler les signes + ou —.

Le calcul de la teneur en unités d'un sérum est basé sur le principe suivant : « La quantité d'un sérum qui, ramené au volume de 1 centimètre cube avec de l'eau physiologique, détermine la floculation « standard » avec la suspension d'antigène *b*, après un séjour de 7 heures à 37°, est considérée comme renfermant 4 unités. »

Comme souvent aucun tube, dans les séries examinées, ne présente la floculation « standard », le calcul des unités doit être fait d'après des tubes où d'autres degrés de floculation se sont produits. On se sert, pour cela, d'une table qui exprime les relations numériques existant entre les autres degrés de floculation et la floculation « standard ».

Comme la sensibilité des extraits de cœur peut varier, la valeur de chaque extrait est exprimée par un coefficient qui représente sa sensibilité par rapport à celle d'un extrait de cœur étalon.

Enfin la période de séjour des tubes au bain-marie étant portée de 20 à 22 heures et même, si cela est nécessaire, de 40 à 44 heures, le coefficient de chaque extrait est corrigé par un coefficient de temps : 1,56 pour un séjour de 20 à 22 heures au bain-marie et 2,6 pour un séjour de 40 à 44 heures.

Pour la pratique courante, une table numérique a été dressée, qui tient compte de tous ces coefficients, à l'exception du coefficient de suspension qui, naturellement, varie avec l'extrait de cœur employé.

Le calcul du nombre d'unités d'anticorps par centimètre cube se fait immédiatement, grâce à la table suivante. On prend le nombre se rapportant au degré de floculation observé dans la colonne du tube correspondant et on le multiplie par le coefficient de suspension de l'extrait de cœur employé.

Table pour 20-22 heures de séjour au bain-marie

Degré de floculation	Numéros du tube								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Total.......	1,60	3,20	6,7	16,8	33,9	59,	118	298	592
Total—	1,29	2,58	5,4	13 5	27,2	47,5	95	240	477
Stand + . ..	1,01	2,02	4,2	10,6	21,3	37,2	74	187	373
Stand.	0,80	1,60	3,3	8.4	16,9	29,5	59	149	296
Stand—. . ..	0,67	1,35	2.8	7,1	14,2	24,8	49,5	125	248
Trace + ...	0,57	1,14	2,37	6,0	12.0	20 9	42	106	210
Trace.......	0,48	0,96	2,00	5,0	10 2	17.7	35,4	89	178
Trace—	0,42	0.83	1,73	4,4	8,8	15,3	30,7	77	154
Trace	0,33	0,66	0,37	3.4	6;9	12,1	24,2	61	121

Si un sérum, au bout de 20 à 22 heures, ne contient que 1,5 unités ou moins, il est remis au bain-marie pour une nouvelle période de 20 à 22 heures. On lit alors les résultats sur les deux premiers tubes et les unités qu'ils contiennent sont calculées d'après la table suivante, en se rappelant que les chiffres doivent être multipliés par le coefficient de suspension de l'extrait de cœur employé.

Degré de floculation	Numéros des tubes		
	1	2	3
Totale	0,83	1,65	3,44
Totale—	0,70	1,40	2,92
Stand + ...	0,58	1,15	2,40
Stand.	0,48	0,96	2.00
Stand —	0,42	0,85	1,76
Trace + ...	0,37	0,75	1,56

Précautions a observer. — Si un sérum infecté donne une réaction négative, le résultat peut être considéré comme exact, car un sérum à réaction positive qui s'infecte ne donne jamais une réaction négative. Au contraire, si un sérum infecté donne une réaction positive, l'expérience doit être recommencée avec un nouvel échantillon.

Il ne faut pas ajouter au sérum des antiseptiques, comme l'acide phénique, le formol, etc., qui peuvent fausser les résultats.

Tous les tubes doivent être très minutieusement lavés à l'eau distillée, car une trace d'acide peut provoquer une floculation dans le mélange sérum-antigène.

Interprétation des résultats. — Les sérums contenant moins d'une unité sont considérés comme négatifs. Les sérums contenant plus de 1,5 unités sont considérés comme positifs. Les sérums contenant de 1 à 1,5 unités ne sont considérés comme positifs que dans les cas reconnus de syphilis.

Avec le liquide céphalo-rachidien, la réaction est considérée comme positive avec plus de 4 unités et négative avec moins de 1 unité.

D'une façon générale, les auteurs ont trouvé que les cas non traités de syphilis congénitale présentent dans leur sérum une teneur élevée en anticorps de 50 à 1.000 unités. Au contraire, les cas non traités à la période primaire, ou les cas traités aux périodes primaire, secondaire et tertiaire ont un sérum peu riche en unités d'anticorps ou donnent une réaction négative. Le liquide céphalo-rachidien contient peu d'unités d'anticorps comparativement au sérum.

*
* *

C. — Méthode syphilimétrique de Vernes.

Le point de départ physique de la méthode est le suivant :

I. — Une suspension de granules très petits (de l'ordre du millionième de millimètre), dans un liquide approprié, possède des propriétés qui varient suivant le poids de la matière en suspension et son degré de division.

II. — Le mélange d'une suspension de granules très petits avec du sérum humain peut produire un trouble ; ce trouble augmente ou diminue selon qu'on fait varier : *a*) la proportion du sérum dans le mélange ; *b*) le nombre et la dimension des granules en suspension ; *c*) les conditions de température.

La suspension est faite avec un extrait alcoolique de cœur de cheval préparé de la façon suivante (péréthynol) :

Prendre un cœur frais. Hacher ce qui est muscle ; mettre le hachis dans l'alcool absolu et laisser en contact une heure en agitant de temps en temps : exprimer, mettre en couche mince et dessécher à 37°. Broyer finement au moulin. Epuiser à l'appareil de Soxhlet 30 grammes de cette poudre (mêlée à 60 grammes de sable lavé et épuisé à l'alcool) avec 250 centimètres cubes de perchlorure d'éthylène (distillé entre 115° et 121°) et dans les conditions suivantes : le ballon qui contient le perchlorure est chauffé au bain-marie ; la douille de l'appareil est surmontée d'un réfrigérant de Vigreux relié à une pompe à vide (boucher au liège, luter à la paraffine, etc.). Distiller le perchlorure sans dépasser 35° et de façon à produire 40 siphonnements en 6 heures et demie (bain-marie 60° à 65°, pression 4 centimètres cubes). Sécher la poudre ainsi traitée à 37°, puis l'épuiser de nouveau à l'appareil de Soxhlet avec 200 centimètres cubes d'alcool absolu dans les conditions suivantes : distiller au bain-marie sans dépasser 30° et de façon à avoir 30 siphonnements en 5 heures (bain-marie 60° à 65°, pression 5 centimètres cubes à 6 centimètres cubes de mercure). Recueillir le liquide du ballon, laisser reposer 24 heures, filtrer sur papier. Déterminer l'extrait sec en portant 10 centimètres cubes de liquide à 60° pendant 8 à 9 heures jusqu'au point constant. Ramener au titre de 15 grammes d extrait sec par litre, soit par addition d'alcool, soit par évaporation dans le vide au-dessous de 30°.

Technique de la réaction — Le sérum à éprouver doit être chauffé à 55° pendant 15 à 20 minutes. La température doit être rigoureusement contrôlée.

Les manipulations doivent se faire à une température d'environ 20°, les variations de température pouvant avoir un effet sur les résultats de l'expérience.

Le péréthynol est dilué à 1 pour 6,5 (1 + 5,5) dans l'eau distillée au moyen de l'appareil mélangeur (Leune, constructeur). Cette dilution se fait en deux temps ;

1° Dilution au tiers (1 de péréthynol + 2 d'eau). Dans un verre cylindrique à fond plat (30 millimètres de diamètre intérieur) introduire 6 centimètres cubes d'eau bidistillée, descendre l'hélice (15 millimètres de diamètre) dans le verre,

de manière qu'elle soit entièrement recouverte d'eau sans toutefois qu'elle touche le fond. Mettre en marche le moteur et, en suivant les indications du tachymètre fixé sur l'appareil, agir sur le rhéostat, jusqu'à ce que la vitesse de rotation de l'hélice soit de deux cents tours à la minute, puis au moyen de la pipette de 3 centimètres cubes, dont l'écoulement est réglé par un robinet spécial à un centimètre cube par minute, laisser couler la dose de péréthynol. La position de la pipette doit être telle que les gouttes tombent dans l'eau d'une hauteur de 3 à 4 centimètres, que le capillaire inférieur soit vertical et qu'il ne touche ni les parois du verre, ni la tige de l'hélice.

2° Pour amener la suspension à sa dilution définitive (1 p. 6,5) enlever la pipette et verser en filet mince 10,5 centimètres cubes d'eau bi-distillée ; alors seulement, arrêter l'agitateur.

Pour la préparation de cette suspension, on peut employer une pipette de 6 centimètres cubes (doubler les quantités d'eau et se servir d'un verre de 40 millimètres de diamètre et d'une hélice de 35 millimètres), mais on ne peut opérer avec moins de 3 centimètres cubes de péréthynol, car au début de la dilution l'eau ne couvrirait pas l'hélice ; de plus, cela entraînerait une augmentation d'opalescence de la suspension obtenue, et par suite fausserait les résultats.

La suspension doit être employée dans les deux heures qui suivent sa préparation et seulement après avoir repris la température du laboratoire, la dilution ayant produit un échauffement.

Après avoir retiré les sérums du bain-marie à 55°, les laisser refroidir dans le laboratoire pendant cinq à dix minutes. Pour chaque examen, deux tubes seulement sont indispensables : un tube à péréthynol et un tube témoin ; cependant il est préférable, toutes les fois que la quantité de sérum sera suffisante, de préparer des tubes en double, comme contrôle.

Avec un rhéomètre réglé à 0,4 centimètres cubes distribuer 0,8 centimètres cubes de sérum (2 cylindrées) dans les quatre tubes. Ces distributions doivent être faites dans le laboratoire à température constante (20°) ou, tout au moins, les tubes devront y être portés aussitôt après.

Trente minutes après la fin du chauffage, ajouter, dans

deux des tubes 0,4 centimètres cubes de la suspension de péréthynol et dans les deux autres (témoins) 0,4 centimètres cubes d'eau bidistillée alcoolisée à 1 pour 6,5 d'alcool absolu.

Agiter soigneusement les porte-tubes plusieurs fois s'il est besoin pour assurer le mélange intime des deux liquides (à ce moment de l'expérience ne pas boucher les tubes avec le doigt pour les agiter par renversement).

Boucher les tubes au caoutchouc et les placer pendant quatre heures à 25° dans un bain-marie.

Les lectures des résultats se font dans le laboratoire à température constante ; on détermine en densité optique, à l'aide du photomètre, l'absorption du tube à péréthynol et celle du tube témoin ; le témoin permettant de tenir compte de l'opalescence propre du sérum et de sa couleur (présence des pigments biliaires ou d'hémoglobine), la différence des deux lectures mesure bien le trouble formé par le mélange du sérum et du péréthynol (absorption du précipité en suspension). Cette différence, exprimée en centièmes, est inscrite sur le dossier du malade. Les mesures répétées avec les tubes de contrôle doivent donner le même résultat (à trois centièmes près). Pour les sérums normaux, la différence est nulle ou au plus égale à 6.

*
* *

D. Réaction de Gaté et Papacostas. Formol-gélification des sérums syphilitiques.

Ajouter à 1 centimètre cube de sérum très clair deux ou trois gouttes de formol du commerce, et abandonner le tout 24-30 heures à la température du laboratoire. Les sérums à Wassermann positif forment une gelée, alors que les sérums à Wassermann négatif restent liquides. Cette réaction concorde avec celle de Wassermann dans 85 % des cas.

La réaction est indépendante de l'inactivation des sérums par la chaleur. Les sérums peuvent être anciens de 48 heures ou même plus s'ils ne sont pas contaminés.

*
* *

E. — Réaction de la méiostagmine.

Lorsqu'on ajoute à un sérum dilué un extrait alcoolique de microbes, la tension superficielle est abaissée comparativement à un mélange sérum dilué et eau physiologique. La diminution de la tension superficielle, faible ou peu marquée pour les sérums normaux, est d'autant plus intense que les sérums contiennent plus d'anticorps vis-à-vis de l'extrait alcoolique employé comme antigène. On la mesure par l'augmentation du nombre de gouttes compté au stalagmomètre de Traube.

Pour le diagnostic de la fièvre typhoïde, par exemple, on emploie une série de tubes contenant 9 centimètres cubes de sérum dilué au 1/20 ; dans le 1er tube on ajoute 1 centimètre cube d'eau physiologique à 8,5 p. 1.000 (témoin) ; dans le 2e, on ajoute 1 centimètre cube d'extrait alcoolique de bacilles typhiques dilué au 1/10 ; dans le 3e, 1 centimètre cube du même extrait dilué au 1/100 ; dans le 4e, 1 centimètre cube du même extrait dilué au 1/1.000 et dans le 5e, 1 centimètre cube du même extrait dilué au 1/10.000 On mélange intimement par agitation. On compte les gouttes immédiatement au stalagmomètre ou après 2 heures à 37°. Suivant la dilution d'antigène, le nombre de gouttes augmente de 1,8 à 3,7.

La réaction de la méiostagmine a été appliquée au diagnostic d'un grand nombre de maladies : tuberculose, syphilis, échinococcose, cancer, etc., mais ses résultats sont discutables.

*
* *

F. — Réaction du benjoin colloïdal.

Cette réaction ne peut être recherchée qu'avec le liquide céphalo-rachidien. N'employer que de la verrerie très propre, lavée dans l'acide chlorhydrique à 2 % dans l'eau, puis rincée deux fois à l'eau distillée.

Les réactifs sont : 1° une solution de NaCl chimiquement pur à 0 gr. 10 p. 1.000 ; 2° 1 gramme de benjoin (résine de

benjoin pure dans 10 centimètres cubes d'alcool absolu) ; laisser en contact 48 heures jusqu'à dissolution, décanter. Pour la réaction, prélever 0 cc. 3 de la solution alcoolique claire, qui sont versés lentement dans 20 centimètres cubes d'eau distillée tiédie à 35°.

Avoir soin de n'employer que de l'eau récemment distillée et une suspension de benjoin fraîchement préparée.

Technique originale : 16 tubes.

1° Tube 1 : 0,25 centimètres cubes de la solution de NaCl ; tube 2 : 0,5 centimètres cubes de la solution de NaCl ; tube 3 : 1,5 centimètres cubes de la solution de NaCl ; tubes 4 à 16 : 1 centimètre cube de la solution de NaCl.

2° Ajouter le liquide céphalo-rachidien dans la proportion suivante : tube 1 : 0,75 centimètres cubes ; tube 2 : 0,5 centimètres cubes ; tube 3 : 0,5 centimètres cubes.

Prélever dans le tube 3 (1,5 centimètres cubes de solution NaCl + 0,5 centimètres cubes de liquide céphalo-rachidien) 1 centimètre cube du mélange, que l'on reporte dans le tube 4 en brassant, et ainsi de suite jusqu'au tube 15. Rejeter le centimètre cube provenant du tube 15. Le tube 16 ne reçoit pas de liquide céphalo-rachidien.

3° Dans chacun des 16 tubes, verser 1 centimètre cube de la suspension aqueuse de benjoin. Le tube 16 sert de témoin. Laisser à la température du laboratoire et lire les résultats après 12 heures.

Technique simplifiée : 5 tubes, pas d'eau chlorurée, de l'eau distillée :

1° Tube 1 : 0,5 centimètres cubes d'eau distillée ; tube 2 : 1,5 d'eau distillée ; tubes 3 à 5 : 1 centimètre cube d'eau distillée.

2° Ajouter le liquide céphalo-rachidien. Tubes 1 et 2 : 0,5 centimètres cubes.

Dans le tube 2 prélever 1 centimètre cube du mélange et porter dans le tube 3 ; procéder de même pour les tubes 3 et 4, mais rejeter le centimètre cube prélevé dans le tube 4. Le tube 5 ne reçoit pas de liquide céphalo-rachidien. Les dilutions du liquide céphalo-rachidien sont les suivantes : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16.

3° Verser dans chacun des 5 tubes 1 centimètre cube de la suspension aqueuse de benjoin. Le tube 5 sert de témoin.

Laisser à la température du laboratoire et lire les résultats après 12 heures.

Résultats. — Dans les tubes positifs, la précipitation du benjoin est totale, le liquide est clair. La résine est sédimentée au fond du tube. Dans les tubes négatifs, le liquide reste trouble. Il n'y a pas de précipité.

Dans les réactions positives, la précipitation s'observe dans les 5 premiers tubes (d'où l'emploi de la technique simplifiée pour un diagnostic rapide) et peut même s'étendre aux tubes 9 et 10.

Le liquide céphalo-rachidien normal donne souvent une précipitation dans les tubes 6, 7, 8, jamais dans les tubes 1 à 5.

La réaction ne peut pas être pratiquée avec des liquides xanthochromiques ou hémoglobiniques qui précipitent le benjoin dans la zone syphilitique.

CHAPITRE XXVI

RECHERCHE ET TITRAGE DES LIPOIDES LIBRES ET DES FERMENTS SPÉCIFIQUES DE DÉFENSE DANS LES HUMEURS ET DANS LES ORGANES.

A. — **Réaction d'activation du venin de cobra** (*Calmette*).

Cette réaction a pour objet la recherche et le titrage des *lipoïdes libres dans les humeurs* (sérum, liquide céphalo-rachidien, etc.), le *venin de cobra* n'étant susceptible d'hémolyser les globules rouges de mammifères qu'en présence de quantités variables de ces lipoïdes.

On doit avoir à sa disposition :

1° Une solution mère de venin de cobra au centième, chauffée 30 minutes à 75° et filtrée sur papier (0 gr. 1 de venin sec dans 10 centimètres cubes d'eau salée physiologique), fraîchement préparée et ne datant pas de plus de 10 jours (conservée à la glacière) ;

2° Une dilution au 1/500 de venin, faite au moment de s'en servir en diluant 1 centimètre cube de solution mère qui contient 0 gr. 01 de venin sec, dans 4 centimètres cubes d'eau salée physiologique (à 8,5 de NaCl par litre) ;

3° Une solution de lécithine au dix-millième, préparée en dissolvant 1 gramme de lécithine pure dans 100 grammes d'alcool méthylique pur. On prend 1 centimètre cube de cette solution qu'on porte dans 99 centimètres cubes d'eau salée physiologique ;

4° Une émulsion au 1/20 d'hématies de cheval débarrassées de sérum par trois centrifugations et lavages à l'eau physiologique successifs.

Dans une série de tubes à essai, on verse 1 centimètre cube d'une solution de venin de cobra au 1/500, soit 2 milligrammes, puis 1 centimètre cube d'émulsion au vingtième d'hématies de cheval soigneusement lavées.

Chaque tube, sauf le premier, qui sert au contrôle, reçoit ensuite respectivement 0 cc. 01, 0 cc. 05, 0 cc. 1, 0 cc. 5 et 1 centimètre cube du sérum à étudier (préalablement inactivé par 30 minutes de chauffage à 58° au bain-marie).

On complète partout à 3 centimètres cubes avec H^2O physiologique.

On porte à l'étuve à 37° pendant 30 minutes et on lit les résultats.

Dans une autre série de tubes témoins, on verse la même quantité de venin de cobra (2 milligrammes), la même quantité d'émulsion d'hématies de cheval lavées et (sauf dans le premier tube qui sert au contrôle) des proportions variables de la solution de lécithine pure au dix-millième, par exemple : 0 cc. 03, 0 cc. 05, 0 cc. 08, 0 cc. 1, etc. On complète partout à 3 centimètres cubes et on porte également à l'étuve pendant 30 minutes à 37°. On lit les résultats.

Si le tube de la première série, contenant 0 cc. 1 du sérum à étudier, donne une hémolyse complète dans le même temps que le tube de la seconde série qui contient 0 cc. 05 de solution de lécithine au dix-millième, par exemple, on en déduit que 1 centimètre cube de ce sérum renferme 0 gr. 00005 de lécithine ou d'autres lipoïdes susceptibles d'activer le venin. La part de la lécithine dans cette activation peut être séparée par l'addition de quelques gouttes de solution au dix-millième de chlorure de calcium qui empêche l'action activante des acides gras et des savons.

On trouve de la lécithine libre dans le sérum des tuberculeux, parfois des syphilitiques, des déments, des paralytiques généraux (psycho-réaction, dite de Much), etc., et dans celui des sujets anesthésiés par le chloroforme ou par l'éther.

Le sérum (même inactivé par chauffage à 58°) de certaines espèces animales (cheval, chien, rat, chèvre, mouton, lapin) est activant pour le venin de cobra. Le sérum d'homme, de singe, de bœuf, de porc, ne l'est que lorsqu'il n'a pas été inactivé par le chauffage.

B. — Méthodes d'Abderhalden et de Wollman pour la mise en évidence de la protéolyse.

a) *RÉACTION D'ABDERHALDEN*

La réaction d'Abderhalden permet, d'après son auteur, de déceler, dans le sérum, des ferments spécifiques, ferments protecteurs, ou ferments de défense qui attaquent les protéines déversées dans la circulation. C'est ainsi que, pendant la grossesse, des ferments apparaissent dans le sang maternel, qui attaquent les albumines et les peptones d'origine placentaire. Lorsqu'on met en contact, dans un dialyseur placé dans l'eau distillée, le sérum contenant un ferment spécifique et l'albumine correspondante, la molécule albuminoïde dégradée donne naissance à des produits dialysables qui passent dans l'eau distillée, où elles sont décelables par les réactifs des peptones, des polypeptides et des acides aminés, la ninhydrine en particulier. Les albumines non attaquées ne dialysent pas.

On opère sur une petite quantité de matière albuminoïde : tissus privés de sang, corps microbiens privés des peptones du milieu et dégraissés. On fait bouillir pendant 5 minutes, on filtre, et à 5 centimètres cubes de filtrat, on ajoute 1 centimètre cube de ninhydrine à 1 p. 100. On fait bouillir de nouveau pendant une minute. Si, après 30 minutes, il ne se produit aucune coloration violette, on essore les fragments de tissus ou les microbes entre plusieurs épaisseurs de papier filtre, sans les toucher avec les doigts. Dans le fond d'un dialyseur dont la perméabilité aux peptones et l'imperméabilité aux albumines ont été préalablement éprouvées, on dépose 0 cc. 25 du tissu ou des microbes, essorés comme il vient d'être indiqué, et 1 centimètre cube du sérum à éprouver non chauffé ; dans un second dialyseur témoin, on verse 1 centimètre cube de sérum seulement et dans un troisième, 1 centimètre cube de sérum chauffé 60 minutes à 58°, et on couvre le tout de toluène. Les trois dialyseurs sont introduits dans trois flacons d'Erlenmeyer contenant 20 centimètres cubes d'eau distillée stérile qu'on couvre ensuite d'une mince couche de toluène (1/2 centimètre cube). On bouche stérilement les flacons et on les porte à l'étuve

à 37° où on laisse la dialyse se poursuivre pendant 16 heures. Après ce temps, on enlève les dialyseurs avec une pince flambée, en agitant le dialysat. On prélève ensuite dans chaque flacon 10 centimètres cubes de liquide qu'on verse d'abord dans des verres stériles, secs, où le toluène entraîné s'évapore, puis dans des tubes à essai contenant 0 cc. 2 d'une solution de ninhydrine à 1 p. 100. On introduit dans chaque tube une petite baguette de verre bien sèche, pour obtenir une ébullition régulière, et on fait bouillir pendant une minute dans la flamme d'un bec Bunsen. On laisse refroidir ; après une demi-heure on lit les résultats. La réaction est positive quand les liquides témoins-sérum restent incolore et que le dialysat du mélange sérum tissu ou microbes présente une teinte bleu violet plus ou moins intense.

Cette technique comporte tant de causes d'erreur et les renseignements qu'elle fournit sont d'une imprécision telle qu'il est préférable dans la pratique de rechercher les produits de la protéolyse par la méthode suivante :

b) *RÉACTION DE WOLLMAN AU BACTERIUM COLI*

Le principe de la méthode est le suivant :

Ensemencé dans divers milieux albuminoïdes : blanc d'œuf, caséinate ou albuminate de soude, sérum sanguin (dans certaines conditions), le *Bacterium coli* se multiplie sans produire d'indol. Mais lorsque les protéines des milieux ensemencés avec le *B. coli* ont subi auparavant une action protéolytique quelconque et qu'elles contiennent du tryptophane, l'indol apparaît dans le liquide de culture. Il suffit donc de rechercher l'indol avec le réactif d'Ehrlich au paradiméthylamidobenzaldéhyde, après extraction au moyen de l'éther, pour déceler la protéolyse.

Technique. — Le milieu dans lequel on veut rechercher l'indol est ensemencé de B. coli et placé à l'étuve à 37° pendant 36 à 48 heures. On en prélève une partie qu'on mélange en agitant légèrement avec un volume égal d'éther ; on décante ensuite l'éther et on ajoute le quart environ de son volume d'une solution à 4 p. 100 de paradiméthylamidobenzaldéhyde ; on fait arriver doucement, au fond du

tube contenant ce mélange, 1 à 2 centimètres cubes d'acide chlorhydrique à l'aide d'une pipette effilée. Lorsqu'il existe de l'indol, un anneau rouge violet se forme à la limite des liquides (voir la technique de A. Berthelot pour la recherche de l'indol, chap. XXXIII).

Avant d'appliquer cette réaction à l'étude d'une protéolyse donnée, on doit s'assurer que l'albumine employée contient du tryptophane, acide aminé générateur de l'indol. Pour cela, on soumet cette albumine à la digestion trypsique, à l'hydrolyse acide ou à l'attaque par un microbe protéolytique. Dans le milieu ainsi digéré (et neutralisé si l'on a eu recours à l'hydrolyse acide) on ensemence un B. coli très indologène et on recherche, suivant la technique précédente, s'il y a formation d'indol.

La présence de tryptophane dans l'albumine étant établie, on procède à l'expérience proprement dite : on ajoute cette albumine au milieu qu'on suppose contenir des ferments protéolytiques. Après quelques jours, on y ensemence du B. coli, puis on fait la réaction de l'indol. Un tube contenant l'albumine seule dans l'eau physiologique et un autre contenant le milieu seul servent de témoins.

CHAPITRE XXVII

HÉMATIMÉTRIE ET HÉMATOLOGIE. — CYTOLOGIE ET CYTODIAGNOSTIC. — VITESSE DE COAGULATION. — INDICE OPSONIQUE. — MESURE DE LA RÉSISTANCE GLOBULAIRE.

A. — Solutions conservatrices des hématies.

Liquide de Marcano.	Solution de sulfate de soude de densité 1,020	100 cc.
	Formol du commerce (à 40 %)	1 cc.
Liquides de Hayem. — a)	Eau distillée	200 gr.
	NaCl chimiquement pur	1 gr.
	Sulfate de soude pur	5 gr.
	Bichlorure de mercure	0 gr. 5
a) bis *modifié.*	Eau distillée	200 gr.
	NaCl pur	1 gr.
	Sulfate de soude pur	5 gr.
	Sol. iodo-iodurée (*b*)	3 cc. 5
b) *Sol. iodo-iodurée (de Hayem).*	Eau distillée	100 gr.
	I K	5 gr.
	Iode en paillettes à saturation.	

Le nombre moyen des hématies chez l'homme adulte est de 5 millions par millimètre cube, de 4.500.000 chez la femme et de 6.900 000 chez le nouveau-né.

*
* *

B. — Emploi de l'hématimètre[1].

Cet appareil se compose :

1° D'un tube mélangeur-aspirateur gradué (de *Potain*) pourvu d'un ajutage en caoutchouc, avec lequel on recueille, par piqûre au lobule de l'oreille ou au doigt, une goutte de sang qu'on aspire jusqu'à la division 1. On essuie la pointe du mélangeur avec un papier buvard et,

1. Compte-globules de Malassez, construit par Stiassnie, 204, boulevard Raspail, Paris.

aussitôt, on aspire le liquide conservateur jusqu'à ce que le mélange de sang et de liquide, remplissant la petite ampoule qui contient une perle de verre, arrive au trait 101. On agite pour que la masse de liquide soit bien homogène ; on expulse, en soufflant doucement par l'ajutage de caoutchouc, ce qui restait dans la partie capillaire du mélangeur et on verse une goutte du liquide de l'ampoule sur la partie centrale du porte-objet quadrillé formant chambre humide ;

2° D'un porte-objet chambre humide constitué par une cellule creuse à rigole et portant une lamelle couvre-objet à ressort. La goutte de sang dilué au 1/100 à examiner se trouve ainsi très également étalée entre la partie centrale du porte-objet et la lamelle couvre-objet.

La partie centrale du porte-objet présente un quadrillage gradué à $\frac{1}{5}$. Chaque rectangle de ce quadrillage représente un dix-millième de millimètre cube de sang. On compte les hématies contenues dans un nombre x de carrés, 20 par exemple. On additionne les chiffres ainsi obtenus, en comptant pour 1/2 les hématies qui sont à cheval sur les traits limites. On multiplie ensuite ce chiffre n par 10.000 et on divise par le nombre x de carrés examinés. Le nombre n d'hématies par millimètre cube de sang est alors fourni par la formule :

$$N = \frac{n \times 10.000}{x \text{ carrés}}.$$

Si, au lieu de diluer le sang au 1/100, on veut le diluer au 1/200, ou au 1/300, ou au 1/500, on aspire seulement jusqu'à la graduation 2, 3 ou 5 dans la pipette capillaire avant d'aspirer le liquide dilueur jusqu'au trait 101.

Pour la dilution au 1/200 ou 1/300, la formule devient alors :

$$N = \frac{n \times 20\ 000}{x \text{ (carrés)}} \text{ ou } N = \frac{n \times 30.000}{x \text{ (carrés)}}, \text{ etc.}$$

Avec l'hématimètre de *Thomas-Zeiss*, chaque carré de quadrillage, recouvert de la lamelle, correspond à 1/4000[e] de millimètre cube.

Si n représente le nombre d'hématies comptées et x le nombre de carrés, la formule est alors :

$$N = \frac{4.000 \times 100 \times n}{x}$$

*
* *

C. — Numération et détermination des leucocytes. — Cytodiagnostic.

Pour l'étude des leucocytes vivants provenant d'exsudats, par exemple pour les recherches relatives au pouvoir phagocytaire, il est avantageux, pour éviter la coagulation de la fibrine, de mettre ces éléments en suspension dans le liquide suivant, préalablement stérilisé par la chaleur :

Chlorure de sodium pur.	0 gr. 63
Citrate de soude.	1 gr.
Eau distillée.	100 cc.

Pour la numération des globules blancs, au lieu du liquide de *Hayem* on emploie :

Acide acétique	2 gr.
Eau distillée.	100 cc.
Sol. alc. saturée de bleu de méthylène. .	1 cc.

L'acide acétique détruit les hématies et le bleu colore les noyaux des leucocytes, de sorte que ces derniers sont bien visibles.

On peut également employer le liquide de *Toisson* :

Eau distillée.	260 cc.
Glycérine pure à 30° Bᵉ.	30 gr.
Sulfate de soude.	6 gr.
Chlorure de sodium.	1 gr.
Violet de méthyle 5 ou 6 B.	0 gr. 025

La proportion normale des leucocytes aux hématies dans le sang humain est de 1 p. 830 ; soit :

$$\frac{6.000 \text{ leucocytes}}{5.000.000 \text{ gl. rouges}} \text{ par millimètre cube.}$$

Formule leucocytaire normale.	Polynucléaires.	66	pour 100 leucocytes
	Mononucléaires.	33	
	Eosinophiles.	1	

Chez le chien, le nombre moyen des leucocytes est de

7.500 ; chez le bœuf, de 11.000 ; chez le lapin, de 11.300 ; chez la grenouille, de 180 seulement.

Chez l'homme le nombre moyen s'élève souvent à 7.200.

Le pourcentage des diverses variétés de globules blancs dans le sang normal humain est le suivant :

			Moyenne.
a) *formes myéloïdes.*	Polynucléaires éosinophiles (10 à 15 microns). . .	2 à 4 %	3 p. 100
	Mastzellen (basophiles) (8 à 12 microns). . . .	0 à 1 %	0,5 p. 100
	Polynucléaires neutrophiles (10 à 14 microns). . . .	42 à 75 %	67,0 p. 100
b) *Formes lymphoïdes.*	Lymphocytes (5 à 8 microns).	21 à 25 %	23,0 p. 100
	Grands mononucléaires (10 à 25 microns). . .	4 à 8 %	6,0 p. 100

*
* *

Cytodiagnostic. — Pour effectuer le cytodiagnostic du sang ou d'un exsudat, on étale sur trois lames le culot de centrifugation, en couche mince. On laisse sécher un instant et on fixe :

Une lame par l'alcool-éther, 4 à 5 secondes.

Une lame par l'alcool absolu, 15 minutes ; ou par l'acide chromique à 1 p. 100 une à deux minutes. (Après ce dernier, lavage immédiat à l'eau courante.)

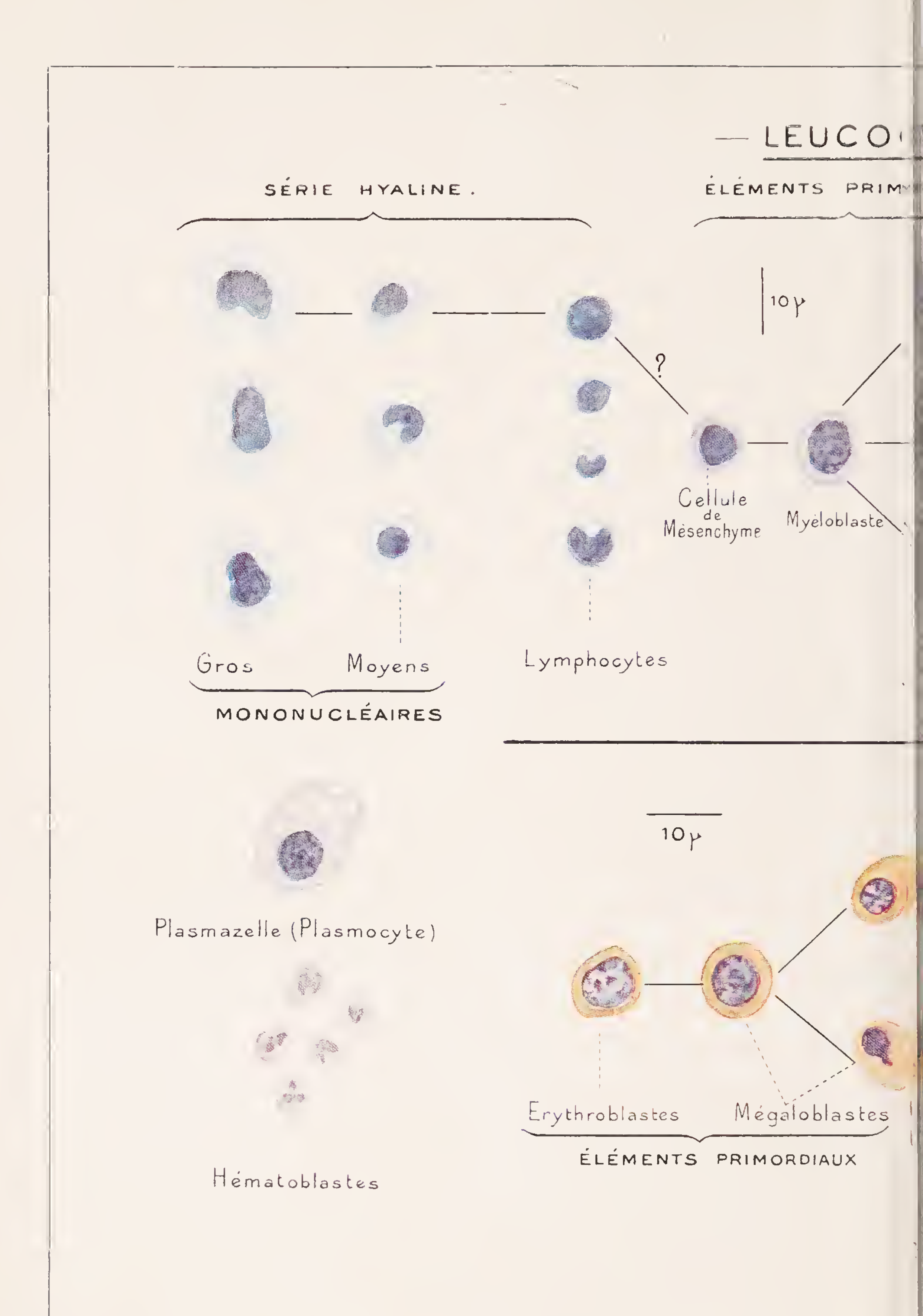
Une lame par le sublimé-iodé, 1 à 2 secondes. (Lavage immédiat à l'eau courante.)

On sèche en position verticale pour éviter les poussières et on colore :

La première lame par hématéine-éosine qui décèle les granulations éosinophiles : hématéine filtrée, 4 à 5 minutes ; lavage à l'eau, puis solution aqueuse d'éosine à 1 p. 200, 1 minute ; laver à l'eau, essorer, sécher et examiner directement dans une goutte d'huile de cèdre.

La deuxième lame par la thionine phéniquée ou par le bleu polychrome de Unna qui colore les granulations basophiles et métachromatiques (coloration 1 minute, puis lavage à l'eau).

La troisième lame par le triacide d'*Ehrlich* qui colore à la fois les granulations éosinophiles et neutrophiles.



MASSON ET Cie, ÉDITEURS.

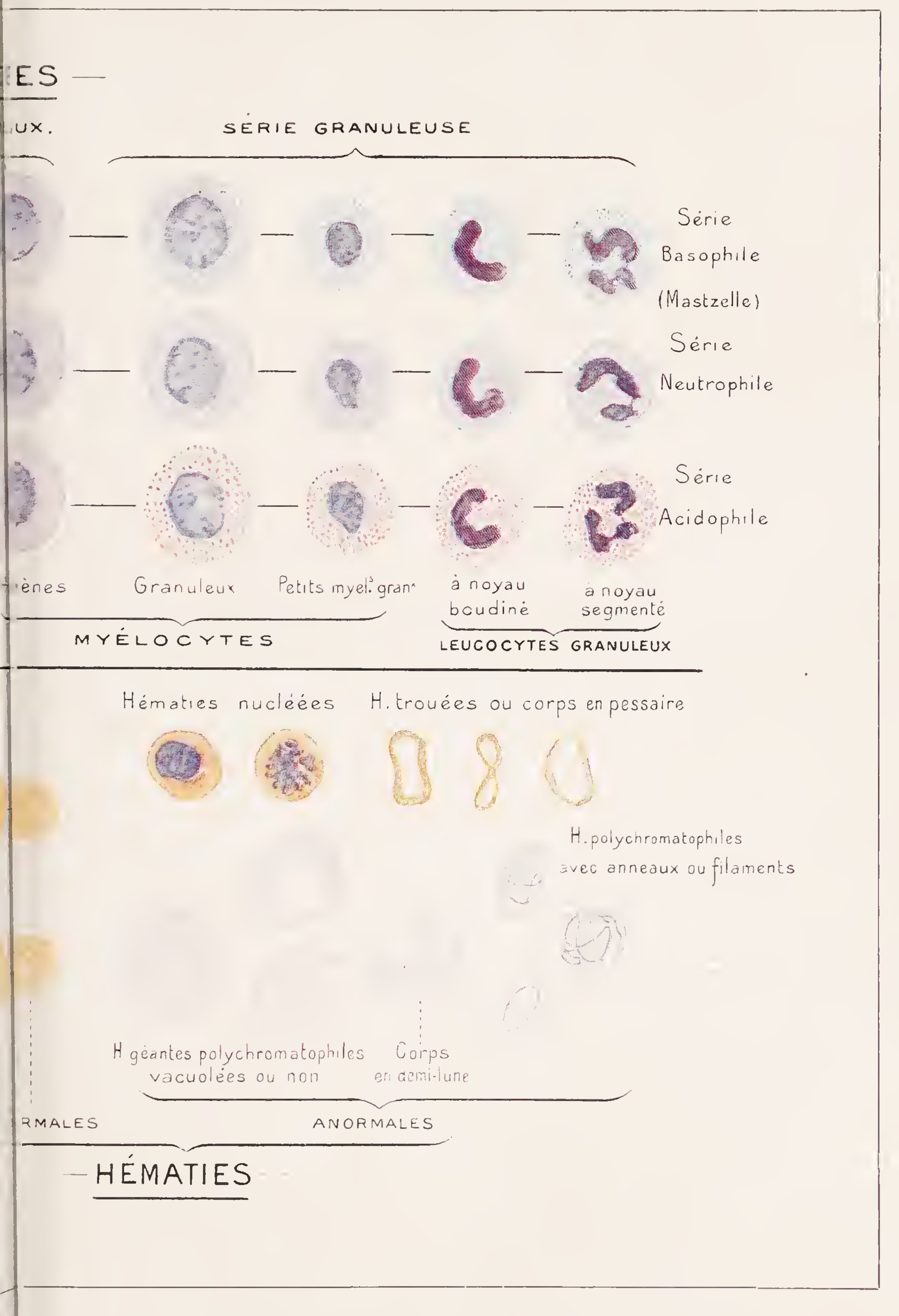


Planche extraite de A. Calmette. — L'Infection Bacillaire et la Tuberculose.

*
* *

Pour le cytodiagnostic des exsudats pleurétiques ou des liquides céphalo-rachidiens, dans lesquels il s'agit surtout de rechercher la proportion des lymphocytes, il suffit de préparer une seule lame que l'on fixe à l'alcool absolu et qu'on colore à la thionine ou au bleu polychrome de Unna, ou mieux au Giemsa dilué à 1 centimètre cube de colorant pur pour 9 centimètres cubes d'eau distillée, 30 minutes, puis lavage à l'eau : les hématies sont colorées en rouge brique, les cellules endothéliales en bleu foncé violacé, les granulations neutrophiles en brun foncé, les éosinophiles en rouge brun, les basophiles en violet.

D. — Numération des leucocytes et des parasites du sang par le procédé de la pipette de Thompson.

Les pipettes *Thompson*[1] se font en deux modèles : l'un de 1/8 de millimètre cube, l'autre de 1/4 de millimètre cube entre chaque division. Le second est plus commode pour les débutants. Le premier est plus approprié au travail rapide et précis

Piquer avec une aiguille le lobule de l'oreille ou la pulpe du doigt ; laisser exsuder une gouttelette de sang sans comprimer les tissus, car la compression force la lymphe et les lymphocytes à sortir des vaisseaux lymphatiques.

Aspirer le sang dans la pipette. En expulser aussitôt une partie jusqu'à ce que la colonne coïncide avec l'une des lignes de la graduation.

Essuyer la pointe de la pipette et expulser 1/8 ou 1/4 de millimètre cube de sang sur une lame très propre. Expulser aussitôt, dans un verre contenant un peu d'eau distillée, le reste du sang contenu dans la pipette et laisser tremper la pointe de celle-ci dans l'eau, afin d'empêcher qu'elle se bouche par suite de la formation d'un caillot.

Expirer la bouche ouverte sur la gouttelette de sang déposée sur la lame, afin d'empêcher qu'elle se dessèche sur les bords, et l'étaler avec la pointe d'une aiguille (posée à

1 Chez C. Baker, opticien, 244, High Holborn, Londres W. C.

plat) en un petit carré d'environ 4 millimètres de côté. Ce carré doit être aussi net et uniforme que possible. Si l'on utilise la pipette de 1/4 de millimètre cube, le carré doit avoir 5 millimètres de côté. (On en délimite, au préalable, l'étendue par un tracé à l'encre ou au crayon gras, *sous* la lame porte-objet)

Sécher le carré à l'air pendant quelques secondes. Fixer deux minutes à l'alcool absolu (20 minutes pour les parasites malariques) et colorer par exemple pendant 20 à 30 minutes avec le Giemsa au 1/20). Laver et sécher sur un papier buvard.

Si l'on désire compter les parasites malariques, le carré sera fait un peu plus petit et plus épais, puis on fixera à l'alcool absolu acétique (5 centimètres cubes d'acide acétique dans 95 centimètres cubes d'alcool absolu). Les hématies sont ainsi décolorées et rendent les parasites plus visibles.

Pour compter les leucocytes, les trypanosomes et les corps en croissants, la décoloration des hématies n'est pas nécessaire.

Nettoyer et sécher immédiatement la pipette en aspirant et refoulant de l'eau plusieurs fois dans le tube capillaire. Répéter ce lavage avec de l'alcool absolu et de l'éther, puis aspirer de l'air et essuyer l'extrémité avec soin.

Si la pipette venait à être obstruée, l'immerger, pour dissoudre le caillot, dans un tube à essai contenant de l'acide nitrique. Placer le tube au bain-marie, le porter à l'ébullition et refroidir plusieurs fois.

Lorsque la pipette est en usage constant, il est bon d'y aspirer un peu d'acide nitrique fort et de l'y laisser toute la nuit. Avant de s'en servir de nouveau le lendemain, on la lave en soufflant dans l'alcool pour s'assurer que les bulles d'air s'échappent librement.

Pour compter les leucocytes ou les parasites, il faut disposer d'un microscope à platine graduée et d'un oculaire à diaphragme carré.

On dépose une goutte d'huile à immersion directement sur le sang séché et coloré, sans lamelle, et on examine avec l'objectif à immersion. On cherche le bord supérieur du carré de sang et, au moyen de la graduation de la platine, on compte combien il y a de champs jusqu'au cinquième, à partir du bord supérieur. Sur cette ligne, on passe

en revue chaque champ transversal d'un bord à l'autre.

On revient à la bande verticale et, au dixième champ à partir du bord supérieur, on examine une nouvelle bande horizontale. On répète la même manœuvre au quatrième champ à partir du bord supérieur et, finalement, on revient à la bande verticale jusqu'au bord inférieur.

Supposons que le nombre de champs microscopiques entre les bords supérieur et inférieur soit de 30 et que le nombre moyen de leucocytes ou de parasites dans les trois bandes complètes soit de 40, on en déduit que le nombre total dans le carré de sang est de $30 \times 40 = 1\,200$. Mais le carré de sang représente 1/8 de millimètre cube (ou 1/4 suivant la pipette employée). Donc le nombre, par millimètre cube, est de $8 \times 1.200 = 9.600$.

Si le carré de sang est de 1/4 de millimètre cube, alors le nombre sera de $4 \times 1.200 = 4.800$.

Il va de soi que, plus le nombre de leucocytes ou de parasites est petit, plus grand sera le nombre de bandes transversales à examiner.

Mais, en règle générale, il suffit de compter les leucocytes sur 3 bandes transversales seulement, si le sang est bien uniformément étalé. Si l'on veut compter toutes les bandes transversales, il faut environ 10 minutes.

L'erreur ne dépasse pas 5 p. 100 sur 200 leucocytes comptés.

Cette méthode évite la dilution du sang et l'emploi de lames quadrillées spéciales. Elle rend possible la mise en réserve de préparations de sang séchées et colorées, que l'on peut garder par devers soi pour faire les numérations plus tard. Elle permet de conserver les préparations pour effectuer ultérieurement des numérations comparatives. Elle permet enfin de faire la numération des diverses espèces de leucocytes.

*
* *

E. — **Coagulation du sang.**

Réactifs empêchant la coagulation :

Oxalate de sodium	1 gr.	p. 1.000 cc. de sang.
Fluorure de sodium.	3 gr.	p. 1.000 —

Citrate de soude. .	4 gr.	p. 1.000 cc. de sang.
Hirudine[1] (extrait de têtes de sangsues).	0 gr. 040 mgr.	p. 1,000 —

On reçoit, par exemple, directement le sang dans un vase contenant, pour 100 centimètres cubes de sang, 5 centimètres cubes d'une solution d'oxalate de sodium à 2 p. 100 ou 10 centimètres cubes d'une solution de fluorure de sodium à 3 p. 100. Le chlorure de calcium (5 centimètres cubes de solution à 10 p. 100 pour 100 centimètres cubes du sang oxalaté) coagule le plasma oxalaté. Il ne coagule pas le plasma fluoré.

MÉTHODE DE WRIGHT POUR MESURER LA VITESSE DE COAGULATION DU SANG

L'instrumentation nécessaire consiste en :

— Plusieurs tubes capillaires de 30 centimètres de longueur, dont une extrémité, effilée en cône et ouverte, est fixée au moyen d'un peu de cire dans l'extrémité, également effilée en cône, d'un bout de tube à essai formant entonnoir ;

— Plusieurs tétines à soupapes de Wright ;

— Un bain-marie réglé à 37° et assez profond pour que les tubes puissent y être entièrement plongés en position oblique, la tétine seule dépassant à l'extérieur ;

— Une petite quantité de mercure bien propre.

Les tubes capillaires étant fixés par l'une de leurs extrémités, au moyen d'un peu de cire Golaz, sur le bout du tube qui porte la tétine à soupape, on les marque, avec de l'encre à écrire sur le verre, de deux traits bien visibles à 5 centimètres de chacune des ouvertures.

On prend un premier tube ainsi monté. On en presse la

1. On peut préparer soi-même un extrait de têtes de sangsues de la manière suivante : On coupe avec des ciseaux et, dans un flacon contenant 100 centimètres cubes d'alcool absolu, on fait tomber le segment antérieur (tête et cou) d'une dizaine de sangsues. On bouche le flacon et on agite à plusieurs reprises. Après 24 heures on recueille les têtes de sangsues sur un filtre, on les sèche dans le vide et on les broie. On obtient ainsi une poudre, que l'on peut conserver à l'abri de l'air et de la lumière, pour en préparer une macération aqueuse par trituration avec quelques centimètres cubes d'eau physiologique au fur et à mesure des besoins. L'extrait obtenu avec trois têtes de sangsues par kilogramme de lapin suffit à empêcher la coagulation du sang pendant plusieurs heures quand on l'injecte dans les veines. *In vitro*, une tête par 30 à 50 centimètres cubes de sang représente, en général, une dose convenable. En présence de cet extrait, le sang reste indéfiniment fluide.

tétine pour chasser l'air, on plonge l'extrémité libre du tube dans du mercure et on en aspire, à l'aide de la tétine, juste la quantité suffisante pour remplir le premier espace de 5 centimètres de longueur.

On plonge, aussitôt après, la même extrémité du tube dans une goutte de sang frais prélevé par piqûre (au doigt ou au lobule de l'oreille chez l'homme). On prend soin de laisser le moins de temps possible cette goutte au contact de l'air.

On aspire le sang dans le tube capillaire, de telle sorte qu'il occupe tout l'espace compris entre les deux traits. L'intervalle compris entre l'ouverture libre et le premier trait sera donc occupé par de l'air, et l'intervalle compris entre la tétine et le second trait sera occupé par le mercure.

Immédiatement après, on plonge le tube dans le bain-marie, en position oblique, pour éviter la projection brusque du mercure (sous l'effort de dilatation) dans le petit entonnoir porte-tétine. On l'y laisse un temps déterminé (le temps de coagulation moyen est de 2'30 pour le sang de l'homme adulte, de 1' à 1'20 pour le sang de cobaye), compté par un indicateur à secondes Le délai qu'on s'était fixé (1, 2, 3 minutes ou fractions de minutes) étant expiré, on sort le tube du bain-marie, on en essuie rapidement l'extrémité libre avec le doigt et, par pression sur la tétine, on projette tout son contenu, mercure et sang, sur un carré de papier à filtrer blanc.

Si le sang n'est pas coagulé, il forme sur le papier buvard une large tache rouge.

S'il est coagulé partiellement, on trouve sur la tache des filaments de fibrine plus ou moins volumineux.

Si la coagulation est complète, le bloc de sang projeté s'étale en un petit tube de même diamètre que le diamètre intérieur du tube capillaire et tache à peine le papier-filtre

Si la coagulation est trop complète (ce qu'il faut éviter), le sang ne peut plus être projeté par pression sur la tétine hors du tube capillaire et on est alors obligé de couper celui-ci.

Il est toujours avantageux de faire cette épreuve avec au moins deux tubes, pour préciser le délai de coagulation.

La mesure, ainsi effectuée, de la coagulabilité du sang, est toute relative, mais elle fournit des résultats assez exactement comparables entre eux.

*
* *

F. — Pouvoir phagocytaire des leucocytes. Mesure de l'indice opsonique.

Pour effectuer la mesure de l'indice opsonique d'un sérum, il faut mettre en présence :

1° Des leucocytes ;

2° Une émulsion microbienne convenablement préparée ;

3° Le sérum à étudier.

Ces trois éléments étant mélangés en parties égales, on les porte dans une pipette, à l'étuve à 37°, pendant quinze ou vingt minutes. On fait ensuite des préparations colorées. On compte les éléments microbiens contenus dans un certain nombre de leucocytes et on établit la moyenne du nombre de microbes phagocytés par leucocyte. On obtient ainsi un chiffre qui indique le *pouvoir opsonique* du sérum considéré. Mais, comme les conditions (concentration de la suspension de leucocytes et de l'émulsion microbienne) changent d'une expérience à l'autre, les résultats obtenus ne sont comparables et ne prennent une valeur que si on les rapporte à un facteur constant, toujours le même dans toute la série des expériences. Ce facteur constant est représenté par un *sérum normal*, celui de l'observateur par exemple. Au pouvoir opsonique de ce sérum *témoin*, on compare le pouvoir opsonique du sérum pathologique étudié.

Le chiffre représentant le pouvoir opsonique d'un de ces sérums, divisé par le chiffre représentant le pouvoir opsonique du sérum normal *témoin* donne l'*indice opsonique*.

a) ***Préparation des leucocytes.*** — Les leucocytes habituellement employés sont empruntés soit au sang humain, soit à l'exsudat péritonéal du cobaye. L'expérimentateur utilise généralement ses propres leucocytes.

Il lui suffit de se piquer avec un vaccinostyle la face dorsale d'un doigt, près de l'ongle, après avoir ligaturé le

doigt à sa base. Environ 20 gouttes de sang sont recueillies dans un petit tube centrifugeur à fond effilé, préalablement garni de la solution anticoagulante dont voici la formule :

Eau distillée.	1.000 cc.
Chlorure de sodium.	8 gr. 5
Citrate de soude.	15 gr.

Il faut 8 ou 10 parties de cette solution, au minimum, pour une partie de sang.

On fait le mélange en renversant et redressant plusieurs fois le tube dont on a obturé l'orifice avec la pulpe du pouce. Il faut avoir soin d'éviter de secouer brusquement, pour ne pas altérer les leucocytes.

On centrifuge, puis on lave le culot. Pour cela on aspire avec une pipette à boule le liquide qui surnage. On verse dans le tube 10 centimètres cubes d'eau salée physiologique que l'on mélange au culot en renversant le tube comme précédemment. et l'on centrifuge de nouveau. Cette opération est répétée trois fois. Puis on enlève tout le liquide. La partie la plus superficielle du culot contient les globules blancs. Afin de la séparer de la couche plus profonde formée des globules rouges, on incline le tube. Les leucocytes de la surface s'étalent alors en surface. Ils sont recueillis par aspiration dans une pipette effilée garnie de la tétine spéciale de Wright, et portés dans un tube à essai court, de très petit calibre (60 millimètres de longueur, 6 ou 7 millimètres de diamètre).

On peut encore se procurer des leucocytes en provoquant, chez le cobaye, la formation d'un exsudat péritonéal par injection d'eau salée, de bouillon, etc. Une ou deux heures après. en piquant l'abdomen du cobaye tenu par un aide, le ventre tendu dirigé en bas, on prélève, à l'aide d'une pipette coudée à pointe effilée, un peu de l'exsudat riche en leucocytes. On recueille celui-ci dans l'eau citratée et on le traite comme il a été dit ci-dessous pour le sang.

b) ***Préparation de l'émulsion microbienne.*** — On prend une jeune culture en milieu solide de 12 à 24 heures. On en émulsionne une anse de platine avec une

baguette de verre dans un tube dans lequel on verse goutte à goutte, quelques centimètres cubes d'eau salée physiologique, de telle sorte que l'émulsion soit bien homogène et légèrement opalescente

S'il s'agit de bacilles tuberculeux, on prend une jeune culture en bouillon glycériné âgée de 10 à 14 jours. On la stérilise à l'autoclave à 100° pendant 20 minutes. On jette sur un filtre en papier et on lave les bacilles en versant sur le filtre de l'eau salée physiologique jusqu'à ce que celle-ci s'écoule incolore. Une petite quantité de bacilles (environ 1 centigramme) est alors prélevée sur le filtre et déposée dans un mortier d'agate. On broie doucement et on émulsionne en versant goutte à goutte (tout en continuant le broyage) de l'eau physiologique à l'aide d'une pipette effilée. On obtient ainsi une émulsion laiteuse que l'on rend encore plus homogène en l'agitant dans un flacon stérile avec des perles de verre. On la centrifuge ensuite (pendant quelques minutes seulement) pour la débarrasser des grumeaux.

Cette émulsion homogène est diluée avec de l'eau salée hypertonique à 1 gr. 5 de NaCl pour 100 (c'est le taux le plus favorable), jusqu'à l'obtention d'une concentration microbienne déterminée qu'on apprécie d'après son opalescence, laquelle doit être très légère. Il faut pour cela environ 50 centimètres cubes d'eau salée pour 1 centigramme de bacilles.

L'émulsion ainsi préparée peut être stérilisée à 105° et conservée en tubes scellés qu'on aura soin de bien secouer avant chaque expérience, pour mettre les bacilles en suspension aussi fine que possible.

c) ***Préparation du sérum à étudier.*** — On se procure le sang chez l'homme par piqûre de la face dorsale du pouce ou du bord postérieur du lobule de l'oreille. Le sang est aspiré par capillarité dans un petit tube à extrémités effilées dont l'une est recourbée. Quelques gouttes suffisent. On laisse pendant deux ou trois heures le sérum se séparer du caillot et on sectionne le tube au couteau à verre au moment de l'usage. Chez les animaux de laboratoire (lapins, cobayes) et aussi chez le bœuf, c'est par piqûre de l'oreille qu'on prélève le sang, en piquant au

niveau d'une des veinules que l'on voit par transparence. Chez la souris et le rat, c'est par section au ciseau du segment terminal de la queue.

Il faut que le sérum soit clair, *parfaitement exempt de globules rouges*, car la présence de ceux-ci fausse complètement les résultats. Il peut être conservé à la glacière pendant 6 à 7 jours, ce qui permet d'utiliser en une seule séance les sérums recueillis pendant toute une semaine, par exemple, chez le même sujet ou chez divers malades.

d) **Technique de la réaction.** — Possédant les trois éléments nécessaires. *leucocytes, émulsion microbienne, sérum*, il reste à les mettre en présence.

On prépare un certain nombre de pipettes capillaires. Il est commode et économique d'employer pour cela des segments de tube de verre de 10 à 12 centimètres de longueur, tels que ceux qui servent à fabriquer les pipettes dans les laboratoires. On les étire en leur milieu en prenant soin que l'effilure soit bien régulièrement calibrée. On sectionne au milieu de la partie effilée et on obtient ainsi deux pipettes de calibre égal.

A deux centimètres de la pointe ouverte, on marque un trait au crayon bleu. On adapte à la pipette une tétine à soupape (de *Wright*) qui sert à l'aspiration et au refoulement. On aspire une petite colonne d'émulsion bacillaire jusqu'à ce qu'elle affleure au trait de crayon bleu. On laisse alors pénétrer une bulle d'air. On aspire ensuite une égale quantité d'émulsion de leucocytes et on laisse pénétrer une nouvelle bulle d'air. On aspire enfin une égale quantité de sérum.

Le tout est alors refoulé sur une lame de verre et mélangé par une série d'aspirations et de refoulements successifs et, la pipette étant tenue bien verticale, on y réintroduit la totalité du mélange. On scelle l'extrémité du tube à la veilleuse d'un bec Bunsen et on porte à l'étuve à 37°, en position inclinée, pendant 20 minutes [1].

1. Si l'on a souvent à effectuer des déterminations d'indices opsoniques, il est recommandable de se servir de la petite étuve spéciale construite pour cet objet, sur les indications de Sir A. Wright, par la maison Hearson, de Londres (235, Regent Street). On peut se procurer cette étuve, ainsi que les tétines à soupapes pour pipettes de Wright, chez Cogit, 36, boulevard Saint-Michel, à Paris.

Au sortir de l'étuve, on brise la pointe de la pipette, on refoule son contenu sur une lame de verre bien propre en brassant de nouveau, et on fait des étalements sur lames avec le bord d'une autre lame rodée.

Les préparations, séchées pendant quelques minutes à l'étuve, sont alors fixées par l'alcool absolu, puis lorsqu'il s'agit du bacille tuberculeux, colorées à froid pendant deux heures à 37°, par une solution de Ziehl contenant seulement 3 p. 100 d'acide phénique. On décolore ensuite par l'alcool acétique, on lave à l'eau, on recolore pendant 30 secondes au bleu de méthylène ou à l'hématoxyline.

S'il s'agit d'autres microbes facilement colorables, on se sert du bleu Borrel à l'oxyde d'argent ou, simplement, de la thionine ou du bleu de toluidine. On lave à l'eau et on évite la décoloration par l'alcool.

La préparation lavée et séchée (lentement à l'étuve) est portée enfin sous le microscope. On passe en revue 100 leucocytes polynucléaires et on note au crayon le nombre de bacilles contenus dans chaque leucocyte, en inscrivant 0 pour chaque leucocyte qui n'a rien phagocyté.

Si l'émulsion microbienne n'a pas été faite à une dilution convenable, la phagocytose est trop abondante ou ne l'est pas assez, et c'est alors une cause d'erreur dans la numération. Il faudra donc recommencer l'expérience en cherchant à obtenir une émulsion qui donne en moyenne de 2 à 4 microbes phagocytés par leucocyte, en présence d'un sérum de sujet normal.

Dans la numération, il ne faut pas tenir compte des amas de microbes. On ne devra noter que les leucocytes bien distincts et bien colorés.

Certains polynucléaires renferment une grande quantité de microbes qu'il est impossible de compter. Dans ce cas, Wright et ses élèves ont adopté le chiffre 9 invariablement.

On établit le *pouvoir opsonique* ou *quotient leucocytaire* de chaque sérum en divisant par 100 le nombre de microbes comptés dans 100 polynucléaires. L'*indice opsonique* est ensuite déterminé en divisant le pouvoir opsonique d'un sérum pathologique, ou supposé tel, par celui d'un sérum normal témoin qu'on utilise dans toute la série des expériences.

Soit le sérum *témoin* T, dont le pouvoir opsonique est, par exemple, déterminé ainsi :

$$\frac{200 \text{ microbes}}{100 \text{ polynucléaires}} = 2$$

et les sérums à étudier A et B. Si nous avons :

$$\text{Pouvoir opsonique de A : } \frac{400 \text{ bacilles}}{100 \text{ polynucléaires}} = 4$$

$$\text{Pouvoir opsonique de B : } \frac{100 \text{ bacilles}}{100 \text{ polynucléaires}} = 1$$

Les indices opsoniques seront :

$$\text{Pour le sérum de A : } \frac{\text{Pouvoir opsonique de A}}{\text{Pouvoir opsonique de T}} = \frac{4}{2} = 2{,}00$$

$$\text{Pour le sérum de B : } \frac{\text{Pouvoir opsonique de B}}{\text{Pouvoir opsonique de T}} = \frac{1}{2} = 0{,}5$$

Nota. — Vis-à-vis du bacille tuberculeux, l'indice opsonique des sérums normaux varie de 0,80 à 1,20. Chez les malades il s'abaisse au-dessous de 0,80.

La détermination d'un indice pris isolément n'offre aucun intérêt. C'est seulement l'étude de la courbe opsonique d'un malade ou d'un animal qui peut permettre de tirer des conclusions utiles au diagnostic, au pronostic ou aux effets d'une médication.

*
* *

G. — Mesure de la résistance globulaire. Hémolyse.

La mesure de la résistance globulaire a pour objet de déterminer la fragilité propre des hématies soit vis-à-vis des solutions salines ou médicamenteuses, soit vis-à-vis des sérums normaux ou pathologiques.

a) ***Résistance des hématies aux solutions salines.*** — Pour déterminer la fragilité propre des hématies provenant du sang d'un malade vis-à-vis du chlorure de sodium par exemple, on prélève, par ponction aseptique à la seringue, 10 centimètres cubes de sang dans une veine du pli du bras et on défibrine aussitôt ce sang par agitation dans un petit flacon stérile contenant des perles de verre.

Lorsque la défibrination est achevée, – ce qui ne demande que quelques minutes, — on aspire 5 centimètres cubes du liquide avec une pipette graduée stérile et on les verse dans un tube centrifugeur préalablement taré. On marque à l'extérieur du verre, par un trait de crayon gras, le volume ainsi occupé par le sang défibriné et on centrifuge jusqu'à séparation complète du sérum.

On décante alors celui-ci ; on remplit le tube avec de l'eau salée physiologique à 9 p. 1.000 ; on agite pour remettre les hématies en suspension et on centrifuge de nouveau.

On répète trois fois cette opération qui a pour but de laver les hématies et de les débarrasser complètement de sérum.

Après la troisième centrifugation et décantation du liquide de lavage, on verse dans le tube une nouvelle quantité d'eau salée physiologique correspondant, aussi exactement que possible, au volume primitif du sang mis en œuvre (5 centimètres cubes), jusqu'au trait de crayon gras marqué à l'extérieur du tube. On agite une dernière fois pour remettre les hématies en suspension bien homogène, et c'est cette émulsion d'hématies lavées dans l'eau physiologique qui sert à effectuer la mesure de la résistance globulaire.

On aura préparé d'avance :

1 série de 12 petits tubes centrifugeurs de 10 centimètres cubes de capacité sur un porte-tubes ;

1 solution de chlorure de sodium *pur*, *fondu*, à 10 p. 1.000, stérilisée à l'autoclave ;

2 pipettes effilées stériles permettant de répartir les liquides par gouttes égales.

Dans chacun des 12 tubes, on versera d'abord un nombre progressivement *croissant* de gouttes d'eau distillée en commençant par 10 gouttes dans le 1er tube et en augmentant de 2 gouttes d'un tube à l'autre. Le 12e tube recevra ainsi 32 gouttes.

Avec la même pipette, on versera ensuite dans chaque tube un nombre progressivement *décroissant* de gouttes de solution salée à 10 p 1.000, en commençant par 40 gouttes dans le 1er tube et en diminuant de 2 gouttes d'un tube à l'autre. Le 12e tube recevra ainsi 18 gouttes.

La proportion de chlorure de sodium pur contenue dans

chaque tube se trouve être ainsi de 0,80 p. 100 dans le 1er tube, puis successivement 0.76 0,72, 0,68, 0,64, 0,60, 0,56, 0,52, 0,48, 0,44, 0,40, et enfin 0,36 p. 100 dans le douzième.

On agite légèrement le support pour mélanger les liquides, puis *avec la seconde pipette* on aspire l'émulsion de sang défibriné lavé et on en laisse tomber une goutte dans chaque tube. Une petite secousse assure le mélange des liquides.

On laisse en contact 30 minutes à la température de 37°, puis on centrifuge rapidement tous les tubes et on lit les résultats.

Suivant que l'hémolyse est nulle, partielle, intense ou totale, on la note par les chiffres 0, 1, 2 et 3, ou par 1 à 3 signes +.

A l'état normal, l'hémolyse se produit à partir de la concentration moyenne de 0,44 à 0,48 p. 100 de NaCl.

Dans certaines maladies, principalement dans les ictères hémolytiques, la fièvre bilieuse hémoglobinurique, la chlorose, etc., les hématies sont particulièrement fragiles. L'hémolyse se produit alors parfois avec des concentrations salines supérieures même à 0,80 p. 100.

On peut mesurer par la même méthode la fragilité ou la résistance des hématies en présence de différents sels ou de substances médicamenteuses, par exemple de la quinine.

Lorsqu'on effectue la mesure de la résistance globulaire, *il y a toujours intérêt à étudier séparément les hématies et le sérum d'un même sang pathologique ; les hématies vis-à-vis du chlorure de sodium ; le sérum vis-à-vis d'hématies d'un sang humain normal.*

b) ***Résistance des hématies à l'action hémolytique des sérums.*** — Les sérums *normaux* sont toujours *anti-hémolytiques.* Au cours de certains états pathologiques ils deviennent, au contraire, *hémolytiques.*

Pour mesurer le pouvoir hémolytique d'un sérum, on se sert d'une méthode tout à fait semblable à celle qui a été décrite ci-dessus. Mais *il est indispensable* que *les hématies lavées dont on doit faire usage proviennent d'un sujet normal.*

C'est sur ces hématies lavées et émulsionnées dans l'eau salée physiologique qu'on fera agir des quantités progressi-

vement décroissantes du sérum pathologique à étudier.

Ce sérum sera employé soit frais, non chauffé, soit après inactivation par 30 minutes de chauffage au bain-marie à 56° ; mais, dans ce dernier cas, il faudra l'activer par addition d'une quantité constante de sérum frais de cobaye (alexine), par exemple 2 gouttes pour chaque tube.

Cette dernière manière de procéder est la plus précise, car si l'on fait usage du sérum pathologique frais, la quantité d'alexine qu'il contient varie pour chaque tube.

On opérera donc de la manière suivante :

Dans chacun des douze petits tubes on verse d'abord un nombre progressivement *croissant* de gouttes *d'eau salée physiologique à 9 p. 1.000,* en commençant par 10 gouttes dans le 1er tube et en augmentant de 2 gouttes d'un tube à l'autre. Le 12e tube recevra ainsi 32 gouttes.

Avec la même pipette, on versera ensuite dans chaque tube un nombre progressivement *décroissant* de gouttes du sérum pathologique à étudier (sérum inactivé par chauffage à 56°), en commençant par 40 gouttes dans le 1er tube et en diminuant de 2 gouttes d'un tube à l'autre. Le 12e tube recevra ainsi 18 gouttes.

La proportion de sérum contenue dans chaque tube se trouve être ainsi de 8 p. 100 dans le 1er tube, puis successivement de 7,6, 7,2, 6,8, 6,4, 6,0, 5,6, 5,2, 4,8, 4,4, 4,0, et enfin de 3,6 p. 100 dans le 12e.

Avec une seconde pipette on laisse ensuite tomber dans chaque tube 2 gouttes de sérum frais de cobaye (alexine). On agite légèrement pour assurer le mélange. Puis, *avec une troisième pipette,* on introduit dans chaque tube une goutte d'émulsion homogène d'*hématies normales* lavées, préparées comme il a été dit ci-dessus.

Une petite secousse assure le mélange des liquides. On laisse en contact pendant 30 minutes à la température de 37° et on lit les résultats qui sont généralement déjà assez apparents pour qu'il ne soit pas nécessaire de centrifuger.

Suivant que l'hémolyse est nulle, partielle, assez intense ou totale, on la note par les chiffres 0, 1, 2 et 3 ou par 1 à 3 signes +.

Cette méthode peut être également employée pour la mesure du pouvoir hémolytique des *sérums hémolytiques*

spécifiques (voir chapitre XXI), — mais il faut alors opérer sur des dilutions au dixième (dans l'eau salée physiologique) de ces derniers, — et aussi pour l'étude des *hémolysines* produites par certains microbes pathogènes dans les humeurs de l'organisme ou dans les milieux artificiels de culture.

CINQUIÈME PARTIE

TECHNIQUES SPÉCIALES

POUR

L'ÉTUDE DES MALADIES INFECTIEUSES DE L'HOMME ET DES ANIMAUX

CHAPITRE XXVIII

RÉCOLTE DE PRODUITS VIRULENTS POUR LE DIAGNOSTIC DES MALADIES INFECTIEUSES DE L'HOMME ET DES ANIMAUX.

A. — Maladies des animaux.

1° *Prélèvement de sang pour ensemencement, inoculation expérimentale ou séro-diagnostic.*

Le sang est récolté dans la jugulaire (Equidés, Bovins, Ovins et Caprins) ou dans la saphène (Chiens).

Couper les poils dans la zone d'élection de la saignée. Laver à l'eau bouillie, puis à l'alcool ; toucher avec la teinture d'iode, opérer avec des instruments et de la verrerie stériles. Ponctionner la veine avec une aiguille un peu forte, adaptée à une seringue de 10 ou de 20 centimètres cubes, recueillir le sang dans un flacon stérile. Boucher solidement le flacon ; étiqueter, emballer, expédier.

2° *Prélèvement de sang pour examen microscopique.* — Essuyer avec un linge fin et propre ou un tampon d'ouate la région choisie (lèvres pour le cheval, pointe et face interne de l'oreille pour les autres animaux), puis, avec la pointe d'une lancette, piquer une veine superficielle, ou, avec les ciseaux, entamer le bord de l'oreille. Toucher avec

l'extrémité d'une lame porte-objet propre la goutte de sang qui sourd. Appuyer le bord d'une lamelle ou d'une carte de visite sur la gouttelette qui s'étend sur toute la largeur de la lame. Incliner la lamelle sur la lame en l'appuyant légèrement et étaler la goutte de sang jusqu'à l'autre extrémité. Sécher immédiatement la lame par agitation, l'envelopper ensuite dans une feuille de papier étiquetée comme il est indiqué plus haut.

3° *Exsudats*. — Pratiquer les prélèvements avec la seringue ou l'aspirateur Potain, en observant les mêmes précautions que pour le sang.

4° *Pus*. — Cautériser superficiellement au fer rouge un abcès clos, ou, à défaut, laver à l'eau savonneuse après avoir coupé les poils, rincer à l'eau bouillie, puis à l'alcool, toucher à la teinture d'iode qu'on laisse sécher. Ponctionner avec une seringue stérile. Aspirer une certaine quantité de pus que l'on introduit ensuite dans un flacon stérile. Etiqueter, etc.

5° *Fragments d'organes pour ensemencements et inoculations*. — Prélever avec des pinces et des ciseaux bouillis, au niveau de la lésion, un fragment du volume d'une noisette qu'on introduit dans un flacon stérile ou (pour le diagnostic de la rage) dans un flacon contenant de la glycérine neutre.

Pour le diagnostic *post mortem* des maladies septicémiques, on prélève, chez les gros animaux, un os long, de préférence un métacarpien ou un métatarsien et, chez les volailles, l'extrémité de la patte coupée au-dessus de l'articulation tibio-tarsienne.

6° *Frottis d'organes pour examen microscopique*. — Le fragment d'organe tenu entre les mors d'une pince est écrasé sur la lame et frotté une seule fois sur la moitié de la surface de la lame. Sécher par agitation à l'air. Etiqueter, etc.

7° *Sécrétions purulentes de la pituitaire et de la conjonctive*. — Nettoyer la région avec un tampon de coton imbibé d'eau bouillie et fixé à l'extrémité d'une baguette de bois. Attendre la formation d'une sécrétion nouvelle (après toux provoquée pour le jetage) qu'on prélève avec l'écouvillon du flacon spécial. A défaut de ce flacon, prélever le produit avec une cuiller ou une spatule bouillie et refroidie, et recueillir dans une fiole stérile.

8° *Expectorations.* — Les expectorations sont recueillies de préférence le matin. Technique : attirer et immobiliser la langue du sujet hors de la cavité buccale, exercer une pression sur les premiers anneaux de la trachée, et, après la toux, recueillir avec l'écouvillon ou la spatule les mucosités déposées sur la base de la langue.

9° *Lait.* — Savonner le trayon et le quartier malades, rincer à l'eau bouillie tiède ; traire avec les mains aseptisées ou pratiquer le catéthérisme. Recueillir directement 10 à 50 centimètres cubes de lait dans des fioles stériles maintenues à 10 centimètres de l'extrémité du trayon. Boucher, etc.

10° *Urine.* — Recueillir l'urine au moment des mictions, ou pratiquer le catéthérisme.

11° *Squames et croûtes cutanées.* — A l'aide du bistouri stérile, gratter la lésion jusqu'au sang. Recueillir dans un flacon stérile les croûtes et les poils adhérents.

12° *Ecoulement vaginal et matières excrémentielles.* — Recueillir une petite quantité de ces matières dans un flacon stérile.

B. — **Maladies de l'homme.**

1° *Prélèvement de sang pour ensemencement. réaction de fixation ou inoculation expérimentale.* — L'opération nécessite : 1° le milieu de culture ou un tube stérile dans lequel le sang sera récolté ; 2° une seringue en verre graduée de 20 centimètres cubes avec embout de métal, stérilisée préalablement à l'autoclave dans un gros tube ; 3° une aiguille en platine de 8/10 à 11/10 de millimètre, stérilisée à l'autoclave dans un tube ; 4° un tube de caoutchouc qui sert de lien.

Pour prélever le sang, on serre le bras avec le lien de caoutchouc un peu au-dessus du pli du coude. On désinfecte la région du pli avec de la teinture d'iode.

Si la veine n'est pas saillante, on prie le sujet de saisir un objet et de le serrer fortement.

On monte l'aiguille sur la seringue en la saisissant par sa base avec une pince flambée ; on l'enfonce fortement, puis, après ajustage, on la passe rapidement dans la flamme.

Avec la main gauche, on fixe la peau, et avec la seringue tenue dans la main droite, on pique la veine de bas en haut.

Dès que l'aiguille a pénétré dans la veine, le sang coule dans la seringue et refoule le piston. On récolte la quantité de sang voulue (10 à 15 centimètres cubes en général). On desserre le lien de caoutchouc et on retire l'aiguille de la veine. On l'enlève ensuite de l'embout métallique qu'on flambe légèrement et on verse le sang dans le récipient. (Tube à essai stérile ou flacon contenant des perles de verre pour défibriner). Eviter soigneusement de toucher l'embout avec les doigts.

2° *Prélèvement de sang pour séro-diagnostic ou examen microscopique.* — Choisir, pour prélever le sang, la face dorsale de la phalangette, région peu sensible et bien irriguée. On peut piquer aussi le lobule de l'oreille. Laver à l'alcool le point choisi. Flamber une épingle ordinaire ou un vaccinostyle. Dès que l'instrument est refroidi, piquer d'un coup sec. Si le sang ne sourd pas de lui-même, comprimer le doigt piqué par une pression partant de sa base, tandis que de l'autre main on fait fléchir la phalangette sur le reste du doigt.

Si le sang est recueilli pour un séro-diagnostic, faire couler les gouttes dans un petit tube stérile.

Si le sang doit être examiné au microscope, toucher une goutte avec l'extrémité d'une lame. Appuyer le bord d'une lamelle sur la gouttelette qui s'étend sur toute la largeur de la lame. Incliner la lamelle sur la lame en l'appuyant légèrement et étaler la goutte de sang jusqu'à l'autre extrémité. Sécher immédiatement la lame par agitation.

3° *Prélèvements pour analyse de liquides retirés par ponction (liquide céphalo-rachidien, sérosités pleurale, péricardique, péritonéale).* — Les recueillir dans des tubes ordinaires ou dans des tubes à centrifugation stérilisés et bouchés à l'ouate. A défaut, se servir de petits flacons soigneusement nettoyés, lavés, rincés, essuyés, puis stérilisés dans de l'eau légèrement salée maintenue 10 minutes à l'ébullition.

Seringue et aiguille passées à l'autoclave ou au moins stérilisées dans de l'eau salée portée à l'ébullition pendant 10 minutes.

Laisser s'écouler les premières gouttes du liquide céphalo-rachidien qui peuvent contenir du sang.

Recueillir directement le liquide qui s'écoule ensuite dans le tube, ou bien l'aspirer dans la seringue que l'on videra ensuite dans le tube.

4° *Prélèvements pour analyse de fausses membranes, de mucosités.* — On se sert d'un fil de fer dont l'extrémité inférieure, légèrement recourbée, est entourée d'ouate de manière à former un tampon étroit et allongé (fig. 8).



Fig. 8. — Ecouvillon de coton monté sur fil de fer pour le prélèvement du mucus rhinopharyngé.

L'extrémité supérieure est tordue en boucle et forme manche. Le fil de fer ainsi préparé est introduit par son extrémité inférieure dans un tube à essai qu'on bouche à l'ouate et qu'on stérilise au four à flamber

Ne toucher avec l'écouvillon que le produit pathologique à prélever.

Pour une angine diphtérique, prélever avec l'écouvillon

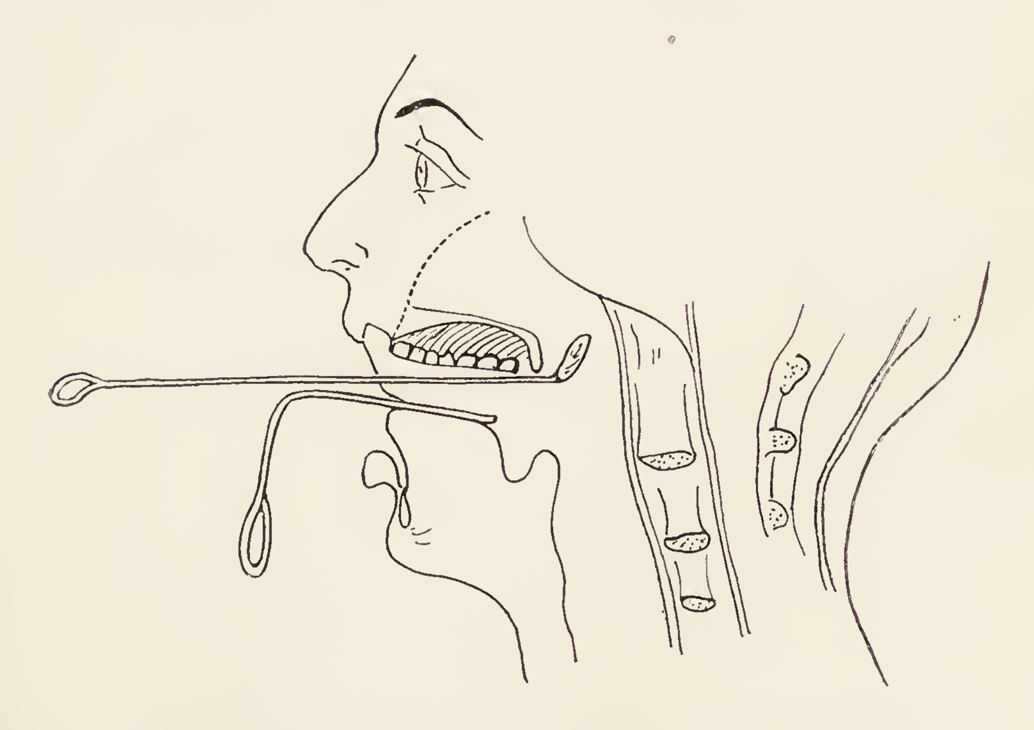


Fig. 9. — Schéma de Dopter, pour montrer la région où le prélèvement du mucus doit être pratiqué.

un fragment de fausse membrane typique ; pour les autres angines, prélever l'enduit le plus épais.

Pour la recherche du méningocoque faire le prélèvement le plus loin et le plus haut possible dans le rhinopharynx (fig. 9)

Dès que le prélèvement a été fait, remettre l'écouvillon dans son tube en évitant de souiller l'ouverture du tube à essai

5° *Prélèvement de crachats.* — Choisir de préférence les crachats expulsés le matin au réveil.

Faire cracher dans une boîte de verre stérilisée qu'on fermera aussitôt. Chez l'enfant ou les personnes qui n'expectorent pas, prélever les mucosités de l'arrière-gorge avec l'écouvillon.

Si les crachats doivent être envoyés par la poste, les recueillir dans un flacon stérilisé par ébullition de 10 minutes dans l'eau salée et bouché avec un bouchon de liége ou de caoutchouc.

6° *Prélèvement de pus.* — Le pus est prélevé par aspiration avec une pipette dans le cas d'un abcès ouvert.

Si la collection est fermée, désinfecter la peau à la teinture d'iode, ponctionner et aspirer le pus avec une seringue stérile.

Si le pus doit être expédié à un laboratoire, le transvaser dans une pipette fermée ou dans un tube ou flacon stériles.

7° *Prélèvement de matières fécales.* — Se servir, pour les recueillir, de flacons stérilisés fermés au liège et dont le bouchon est muni d'une petite cuiller. A défaut de ces flacons, employer des flacons à large ouverture fermés par un bouchon de liège, et stérilisés par ébullition de 10 minutes dans l'eau salée.

Recueillir les selles du malade dans un vase lavé à l'eau salée bouillante puis refroidi

Si le malade est constipé, lui donner un lavement à l'eau bouillie avec un injecteur stérilisé dans l'eau salée bouillante. La petite cuiller sert au prélèvement. Sur le cadavre, ouvrir avec précaution une anse intestinale, prélever avec la cuiller. Si l'autopsie n'est pas possible, on peut prélever les fèces dans le rectum avec la cuiller. Les opérations sur les cadavres doivent, si possible, être pratiquées avec des gants de caoutchouc.

Ne pas salir les bords du flacon. Il suffit d'envoyer le volume d'un dé à coudre de matières fécales. Une plus grande quantité serait inutile et même dangereuse à cause des fermentations qui produisent des gaz et font sauter le bouchon.

Prélever de préférence, quand il y en a, des grains riziformes, des parties sanguinolentes, des parcelles contenant du mucus. Bien boucher le flacon. Attacher le bouchon au goulot avec de la ficelle par un nœud de caviste.

8° *Prélèvements d'urine.* — Recueillir l'urine dans un flacon de 50 centimètres cubes ou plus grand (stérilisé dans de l'eau salée bouillante), avec des sondes stérilisées.

Laver le méat urinaire à l'eau bouillie ; ne pas recueillir la première partie de la miction, mais seulement la fin, ou bien se procurer l'urine par un cathétérisme aseptique.

CHAPITRE XXIX

ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DU SANG, DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN, DES SÉROSITÉS, DU LAIT, DES URINES ET DES SELLES.

A. — Analyse microbiologique du sang.

L'examen à l'état frais d'une gouttelette de sang écrasée entre lame et lamelle est surtout indiqué pour la recherche de la bactéridie charbonneuse, des trypanosomes et des spirilles de la fièvre récurrente. Pour l'examen après coloration, se reporter à la technique générale des colorations (chap. III).

Recherche des bacilles tuberculeux dans le sang. — La technique la plus convenable consiste à extraire à la seringue, d'une veine du pli du bras, 10 ou 20 centimètres cubes de sang qu'on projette aussitôt dans un tube contenant 10 ou 12 centimètres cubes de solution de citrate de soude à 2 p. 100 dans l'eau salée physiologique. On ferme le tube avec un bouchon de caoutchouc stérile, on le retourne 3 ou 4 fois et on le porte à la glacière pendant 24 heures. On décante ensuite le liquide avec précaution et on recueille le sédiment à la pipette pour en faire des préparations colorées. ou pour l'inoculer à des animaux.

L. Bernard, R. Debré et Baron préfèrent traiter immédiatement le sang, au sortir du vaisseau, par 20 centimètres cubes d'alcool à 30° (pour 10 centimètres cubes de sang). Le laquage des globules est ensuite complété par addition progressive de 30 centimètres cubes d'alcool pur à 40°. On agite vigoureusement et on centrifuge pendant une demi-heure. Après décantation, on reprend le culot par 40 centimètres cubes d'alcool à 40°, on agite, puis on ajoute une ou deux gouttes d'une solution alcoolique de soude au 1/10. On centrifuge de nouveau. Le culot minime ainsi obtenu est étalé sur lame et coloré.

Homogénéisation. — Inoscopie (*Jousset*). On recueille le caillot en filtrant sur une compresse bouillie dans l'eau alcaline, puis on lave à l'eau distillée et on fait digérer la fibrine au moyen d'un suc gastrique artificiel.

Peptone en paillettes (titre 50 du Codex).		1 à 2 gr.
Glycérine pure.	aa.	10 gr.
Acide chlorhydrique à 22° Baumé.		
Fluorure de sodium.		3 gr.
Eau distillée.		1 litre.

On mélange 10 à 20 volumes de ce liquide à un volume de caillot, on porte à l'étuve à 37° pendant 3 heures et on centrifuge.

Technique de Bezançon, Griffon et Philibert. — On broie le caillot dans un mortier ; on ajoute 20 centimètres cubes d'eau et V à VI gouttes de lessive de soude, on fait bouillir, on centrifuge et on examine le culot étalé sur des lames de verre.

Technique de Gustave Martin et Lebœuf pour la recherche des trypanosomes et des spirilles. — Recueillir le sang dans un tube à sédimentation contenant 1 centimètre cube de solution citratée. On centrifuge pendant 8 à 12 minutes en vérifiant fréquemment l'état du tube à partir de la 7e minute et on arrête la centrifugation dès que la masse est nettement séparée en deux couches. On recueille toute la couche supérieure que l'on verse dans un deuxième tube à centrifugation et on centrifuge de nouveau pendant 10 minutes. On décante le liquide et on centrifuge une troisième fois pendant 20 minutes. Le sédiment renferme quelques leucocytes, quelques hématies, les globulins et les trypanosomes. Les filaires sont généralement retrouvées dans le deuxième sédiment.

B. — Analyse microbiologique du liquide céphalo-rachidien.

Les germes les plus fréquemment rencontrés dans les liquides céphalo-rachidiens pathologiques sont : les *méningocoques A, B, C, D*, agents de la méningite cérébro-spinale épidémique ; le *pneumocoque*, le *bacille tuberculeux*, le *bacille de Pfeiffer* ; le *streptocoque* et le *staphylocoque*. Plus rares sont le *Diplococcus crassus*, le *pneumo-bacille de Fried-*

lander, le *tétragène*, l'*entérocoque*, les *bacilles typhiques* et *paratyphiques*, le *Bacterium coli*. Exceptionnellement le *bacille pyocyanique*, le *bacille diphtérique*, le *gonocoque* et le *bacille de la peste*. La recherche de ces germes s'effectue suivant la technique suivante, simple et rapide, qui donne des résultats très généralement exacts.

Technique d'O. Jupille et R. Legroux. — Il est nécessaire d'opérer sur 5 centimètres cubes de liquide, quantité moyenne des ponctions lombaires :

1° Le liquide est, le plus tôt possible après la ponction, centrifugé (10 minutes à 5.000 tours, centrifugeur Jouan) Les tubes de centrifugeur sont stérilisés à l'avance.

2° Le liquide clair décanté est mis en tube stérile et placé au frais (glacière si possible), en attendant qu'il puisse être examiné.

3° Une partie du culot de centrifugation prélevé aseptiquement est étalé sur lame, fixé à l'alcool méthylique, puis examiné au microscope, après colorations superposées : méthode de Gram, puis fuchsine en solution aqueuse ; cette dernière solution doit être faible afin de prolonger son action pendant 3 à 4 minutes, pour que l'identification des variétés de leucocytes reste facile. Si ce premier examen ne montre pas de prédominance de polynucléaires ou si les lymphocytes semblent plus abondants, il est indispensable de faire un deuxième étalement de peu d'étendue, au centre de la lame, afin de rechercher les bacilles acido-résistants ; cette recherche étant de grande importance, on doit la faire patiemment. Elle est plus souvent positive qu'on pourrait le penser.

4° L'ensemencement sur gélose-sérum, fait avec le restant du culot de centrifugation prélevé au moyen de l'anse de platine, sera largement pratiqué en tube plat et mis à 37°.

5° Avec le liquide clair mis de côté au début des opérations, on recherche, sur 4 centimètres cubes exactement mesurés, le poids d'extrait sec de cendres d'après la technique suivante (*W. Mestrezat*) : prendre une capsule de nickel ou mieux de platine, la tarer à vide, y verser les 4 centimètres cubes mesurés, évaporer le liquide au bain-marie bouillant jusqu'à ce que le poids de la capsule reste constant lors de deux pesées successives ; le poids trouvé est

multiplié par 250, le produit donne le poids en grammes de l'extrait sec par litre.

Liquide normal, 10 gr. 50 à 11 grammes ; liquide tuberculeux, 11 grammes à 13 grammes ; liquide de méningite aiguë non tuberculeuse 13 gr. 50 à 16 grammes :

L'extrait sec est incinéré dans une flamme jusqu'à ce que la capsule prenne une teinte voisine du rouge cerise ; laisser refroidir la capsule sous une cloche en présence d'acide sulfurique, peser les cendres, multiplier le poids par 250 pour avoir le poids au litre :

Liquide normal, 8 gr. 60 à 8 gr. 80. Liquide tuberculeux, 7 grammes à 7 gr. 50. Liquide de méningite aiguë non tuberculeuse, 8 grammes à 8 gr. 90.

6° Examiner après 15 à 18 heures à 37° les tubes de gélose ensemencés. Prélever une trace des colonies suspectes pour en faire l'examen microscopique sans coloration et après coloration ; suivant les données de cet examen on identifiera, par l'agglutination rapide au moyen des sérums spécifiques, soit les différentes races de méningocoques, soit les pneumocoques des races I, II ou III. S'il y a des streptocoques dans le liquide de ponction, les bactéries pourront être agglutinées par le sérum antipneumococcique type II. Les indications thérapeutiques n'en seraient pas faussées, puisque la sérothérapie II est valable dans ces cas.

*
* *

C. — Analyse cytologique du liquide céphalo-rachidien.

1° *Examen à la cellule de Nageotte du liquide non centrifugé.* — La cellule de *Nageotte* se compose d'une cellule de verre d'une capacité de 50 millimètres cubes, divisée par des traits espacés de 250 μ. Sa hauteur est de 500 μ et chaque division correspond à 1,25 millimètre cube. Pour dénombrer les éléments cellulaires qu'il contient, on dépose une ou deux gouttes de liquide céphalo-rachidien frais dans la cellule, on couvre d'une lamelle, on porte sous l'objectif et on laisse reposer pendant 10 à 15 minutes. On examine avec l'objectif n° 4 ou n° 5 et on compte les leucocytes dans un certain nombre de rectangles. On divise le nombre de

ces leucocytes par le nombre de rectangles et le quotient obtenu par 1.25. On détermine ainsi le nombre de leucocytes par centimètre cube de liquide.

Pour faciliter la recherche des globules blancs, on additionne au préalable le liquide céphalo-rachidien d'un mélange à volumes égaux de violet de méthyle à 5 p. 100 et d'acide acétique pur, dans la proportion d'une gouttelette (1/30 de centimètre cube environ) pour 10 gouttes de liquide. On attend quelques minutes, puis on dépose une ou deux gouttes du liquide coloré dans la cellule de Nageotte et on opère comme précédemment.

Le liquide céphalo-rachidien normal contient 1 à 3 éléments, généralement des lymphocytes, par millimètre cube.

2° *Examen du liquide centrifugé.* — Centrifuger à grande vitesse (5.000 tours) pendant 10 minutes dans des tubes stériles à extrémité effilée et bouchés avec des capsules d'étain. Décanter. Maintenir le tube incliné, la pointe en haut. Introduire une pipette effilée dans laquelle le culot encore humecté monte par capillarité. Répartir le culot sur des lames de verre, à raison d'une gouttelette par lame. Etaler légèrement, sauf sur la lame destinée à la recherche du bacille de Koch. Sécher à l'étuve. Fixer à l'alcool absolu pour la coloration ultérieure au bleu ou à la thionine, à l'alcool-éther pour l'hématéine-éosine. Colorer et examiner suivant les techniques habituelles.

*
* *

D. — Disposition générale d'un examen de liquide céphalo-rachidien (d'après Mestrezat).

1er cas : L'examen est fait dans les 2 heures qui suivent la ponction.

A faire sur le liquide complet.	1° Noter l'aspect (limpide, opalescent, purulent, fortement purulent, la présence ou l'absence de voile fibrineux et de flocons en suspension). 2° Numération, à l'état frais, des *leucocytes* (X gouttes C.-R. 1 gouttelette violet méthyl-acétique : violet additionné de son volume d'acide acétique. Numération à la cellule de Nageotte Le prélèvement des X gouttes sera fait avec les précautions d'asepsie habituelles et après avoir longuement agité le tube.

Centrifugation du liquide : Centrifugation dans des tubes stériles sans épaulement, de Ravaut (deux tubes de préférence), 10 min. à 5 000 tours à la min. Les tubes munis d'une capsule d'étain ont été stérilisés à l'autoclave (1/2 h. à 120°).	1er *tube* (Examen microscopique direct et formule cytologique.)	1er *cas. Liquides d'apparence normale sans culot important*. (Décanter à fond et prélever le culot à l'aide d'une pipette effilée, le tube étant maintenu renversé. Répartir sur 3 lames. Sécher. Fixer 3 minutes à l'alcool méthylique.)	1re *lame*. Gram-Nicolle avec recoloration à la fuchsine-Ziehl diluée (examen microbien direct : indications premières sur la formule cytologique). Désire-t-on une coloration plus différenciée des noyaux, après lecture du Gram, on décolore quelques instants à l'alcool, on lave et on fait agir 3 à 4 secondes un bleu basique (Legroux).
		2e *cas. Liquides purulents*. (Mélanger le culot à la pipette ; en déposer une gouttelette sur 3 lames. Sur 2 lames étaler avec un peu d'eau.)	2e *lame* Ziehl (b. tuberculeux) ou coloration spéciale. (Giemsa dans le cas de parasites.
			3e *lame*. Hématéine (éosine ou Giemsa (formule cytologique) et accessoirement, parasites).
	2e *tube*. (Cultures, inoculations).	On conserve, dans le tube, 2 à 3 millimètres de liquide dans lesquels on émulsionne le culot.	*Cultures*. On ensemence *aussitôt que possible* et aussi *largement* que possible (1/2 du culot) le culot sur deux tubes *gélose nutritive* (gélose-sérum formolé ou gélose-ascite) sur laquelle poussent tous les hôtes habituels du C.-R. Le b de Koch ne pousse pas ; le b. de Pfeiffer peu (utiliser pour lui un milieu au sang) (1). Après culture, les colonies seront étudiées pour l'identification (caractères extérieurs, examen microscopique, essais d'agglutination, repiquage sur milieux spéciaux).

1. La démonstration du caractère aseptique d'un liquide C.-R. comporterait :
1° La prise du liquide à l'aiguille de ponction à l'aide d'une seringue stérile ;
2° Des essais de culture en bouillon Martin glucosé (2 p. C. R. pour 1 p. bouillon, le mélange étant fait au lit du malade), et l'ensemencement de tubes de gélose Veillon.

		Inoculations. Inoculation éventuelle au cobaye, à la souris, au lapin, selon les renseignements fournis par les recherches précédentes.
	Réunion des liquides décantés. (Examen chimique 6 à 10 cc.)	*Examen chimique.* Albumine. . . 1 à 2 cc. Chlorures. . . 2 cc. Sucre. . . . 2 cc 5. Cendres (méningite tuberculeuse) . 4 cc. Urée (azotémie). . . . 2 cc. *Réactions colloïdales.* Benjoin colloïdal. . . . Bordet-Wasserman. . . 1 cc.

2e cas : L'examen du liquide est différé ou ne peut être fait que loin du lieu de son prélèvement. On devra prévoir, dans ces circonstances, les difficultés d'interprétation qui entourent les examens bactériologique et cytologique (fragilité des germes, culture d'éléments étrangers, digestion des éléments cellulaires). L'examen chimique sur les liquides clairs conserve, par contre, toute sa valeur.

N. B. — A tout renseignement diagnostic demandé on fera joindre des *renseignements cliniques* sur la date du début de l'affection, l'évolution du cas et les traitements intra-rachidiens pratiqués.

Le liquide de ponction lombaire est centrifugé 15 minutes à la main ou 10 dans un centrifugeur électrique. si possible dans des tubes de Ravaut stérilisés.	1er *culot.*	Le premier culot est étalé sur deux lames à l'aide d'une pipette effilée. On sèche à l'air et on fixe à la flamme. L'envoi sera fait, les deux frottis se regardant, une languette de papier séparant les deux lames. 1re *lame* : Examen microbien direct et formule cytologique. 2e *lame* : Ziehl ou recherche spéciale.
	2e *culot.*	On décante partiellement, de manière à laisser 2 cc. de liquide environ au contact du culot. On ferme le tube à centrifuger à la lampe et on le joint à l'envoi précédent [1]. (Cultures. Inoculations.)

1. Dans le cas d'un liquide suspect de méningococcie, on ajoutera avec avantage au 2e culot, avant de fermer le tube, 1 cc. d'une solution stérile de glucose à 5 p. 100 (Legroux).

3e Liquides décantés.	Les liquides décantés sont réunis dans un tube à essai propre. On ferme le tube à la lampe et on l'immerge 10 minutes dans l'eau bouillante. Sa conservation est assurée pour plusieurs semaines (Sucre examen chimique).

N. B. — A défaut de matériel stérile, le premier culot et les liquides décantés seront seuls utilisés.

*
* *

E. — Analyse microbiologique des sérosités.

On examine les exsudats non coagulables, purulents ou non, après étalement, fixation et coloration du culot de centrifugation, par la thionine, la méthode de Gram ou la méthode de Ziehl-Nielsen. Pour les exsudats fibrineux coagulables, il est nécessaire de dissocier au préalable le caillot dans un ballon stérile contenant des billes de verre, ou de l'homogénéiser avec de la lessive de soude (méthode de Bezançon, Griffon et Philibert, méthode de Pétrof) ou encore de le mettre à digérer avec du suc gastrique artificiel (voir analyse du sang).

Les sérosités seront ensemencées directement ou après homogénéisation dans les milieux nutritifs ou dans les milieux spéciaux : gélose ascite pour le gonocoque, milieu T pour le pneumocoque, milieux de Petrof pour la tuberculose.

On inoculera les produits morbides au cobaye, dans la cavité péritonéale s'ils sont purs, sous la peau s'ils sont contaminés par des microbes étrangers.

La recherche des anticorps et des antigènes sera effectuée par les méthodes habituelles de la sérologie : déviation du complément, précipitation, floculation.

*
* *

F. — Analyse microbiologique du lait.

Quelles que soient les précautions prises, tous les laits frais destinés à la consommation contiennent un grand nombre de microorganismes : bactéries, moisissures, levures.

La plupart de ces germes sont des microbes saprophytes, mais il en est un certain nombre, comme le bacille tuberculeux, le Bacterium coli, des streptocoques, le Micrococcus melitensis qui sont pathogènes pour l'homme et qu'il importe de mettre en évidence par les techniques du laboratoire.

1° ***Recherche qualitative des microbes du lait.*** — a) *Bacille tuberculeux.* — On centrifuge pendant 1/4 d'heure à 5.000 tours 25 centimètres cubes de lait, additionnés de 50 centimètres cubes d'eau stérile, on recueille la crème et on décante On étale séparément le culot et la crème, sur des lames de verre. On fixe en plongeant la lame pendant quelques minutes dans l'alcool méthylique absolu après dessiccation à l'étuve, puis on colore suivant la méthode de Ziehl-Nielsen. On peut également employer une des méthodes d'ensemencement indiquées au chapitre de la tuberculose et l'inoculation au cobaye.

b) *Bacterium coli.* — Mêmes techniques que pour la recherche du Bacterium coli dans l'eau.

c) *Micrococcus melitensis.* — On recueille le lait aseptiquement dans des tubes stériles débouchés sous le jet de traite. Trois gouttes de lait sont ensuite ensemencées par tube de gélose inclinée qu'on porte à l'étuve et qu'on observe pendant 10 à 15 jours. On dilue une goutte du même lait chauffé 1/2 heure à 56° dans IX ou XIX gouttes d'eau distillée stérile contenues dans un verre de montre flambé, on ajoute IX gouttes d'une émulsion, dans l'eau distillée stérile, d'une culture jeune d'un M. melitensis d'origine humaine, ce qui donne une dilution du lait au 1/20 ou au 1/30. On répartit dans des tubes de 6 millimètres de diamètre et après 6 heures à l'étuve, 24-48 heures à la température du laboratoire, on observe les résultats macroscopiquement et microscopiquement (Sergent, Gillot et Lemaire, Séjournant).

2° ***Recherche quantitative des microbes du lait.*** a) *Numération par les cultures.* — On fait une série de dilutions au 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 dans l'eau sté-

rile, de lait bien homogénéisé par agitation et on incorpore 1 centimètre cube de ces dilutions dans un tube de gélose nutritive, liquéfiée à 45°. On mélange intimement en roulant les tubes entre les doigts et on coule rapidement dans une boîte de Petri qu'on porte à l'étuve à 37°. Après 48 heures, on compte les colonies qui se sont développées à la surface des milieux et on rapporte à 1 centimètre cube. Certains auteurs préfèrent cultiver les germes du lait à 20° en boîtes de gélose ou de gélatine nutritives. On compte alors les colonies après 4 jours.

b) *Numération directe des germes au microscope.* — La méthode préconisée par Prescott et Breed consiste à étaler 0 cc. 01 de lait sur une surface de 1 centimètre carré d'une lame de verre. On sèche à l'air par agitation ou à l'étuve et on fixe en plongeant la lame pendant quelques minutes dans l'alcool méthylique absolu. On colore ensuite avec une solution aqueuse de bleu de méthylène. Il faut éviter d'employer un colorant alcalin qui a l'inconvénient d'altérer la pellicule de caséine. On compte les bactéries au microscope avec l'objectif à immersion. Il est indiqué de combiner objectif et oculaire de manière que le diamètre du champ microscopique soit exactement de 0 cm. 0016, correspondant à une surface de 0 cm² 005. Chaque champ microscopique correspond ainsi à $\frac{2}{500.000}$ de centimètre cube de l'échantillon de lait.

On compte les bactéries de 8 à 10 champs et on prend la moyenne, qu'il suffit de multiplier par 500.000 pour déterminer le nombre des bactéries contenues dans 1 centimètre cube de lait.

Bien qu'elle ne permette de déceler que les bactéries colorables par le bleu de méthylène aqueux, cette méthode très précise et très simple donne, dans la pratique, d'excellents résultats.

*
* *

G. — Analyse microbiologique des urines.

Les urines destinées aux ensemencements et aux inocu-

lations doivent être recueillies aseptiquement par sondage de la vessie.

On recherchera directement les éléments cellulaires anormaux par l'examen, à l'état frais, d'une goutte de liquide entre lame et lamelle, ou après coloration du culot de centrifugation étalé et fixé sur des lames de verre. Une de ces préparations sera colorée à la thionine, une deuxième par la méthode de Gram et une troisième par la méthode de Ziehl-Nielsen pour la recherche des bacilles tuberculeux. Le culot de centrifugation servira également à l'inoculation sous-cutanée au cobaye et à l'ensemencement sur le milieu de Pétrof après traitement par la soude (voir tuberculose, chap. XXXVIII).

Recherche du B. coli. — Ensemencer 1 centimètre cube d'urine fraîche dans 9 centimètres cubes d'eau peptonée. Ajouter ensuite une quantité suffisante d'eau phéniquée à 5 % pour que le titre de la solution soit de 0,85 à 1 p. 1.000. Porter à l'étuve. Si, après 24 heures, la culture est devenue trouble, on la réensemence dans un nouveau tube d'eau peptonée phéniquée. Huit heures après, réensemencer en bouillon ordinaire. Identifier le microbe suivant les techniques habituelles (voir B. Coli, chap. XXXIII).

Technique spéciale pour la recherche du Sp. icterohemorragiæ. — Recueillir aseptiquement 250 à 300 centimètres cubes d'urine. Centrifuger dans plusieurs tubes dont on recueille les culots. Examiner par le procédé à l'encre de Burri ou après coloration par les méthodes de Fontana et Tribondeau ou de Ravaut et Ponselle. A défaut de centrifugeur, on emploiera le procédé de P. P. Levy et Léobardy : Additionner l'urine fraîche de 5 à 6 centimètres cubes pour 100 de formol à 40 pour 100. Agiter. Verser dans de grands tubes 6 centimètres cubes d'alcool à 95° et 40 à 50 centimètres cubes d'urine formolée. Mélanger. Couvrir de ligroïne sur une épaisseur de 2 à 3 millimètres, boucher au liège. Agiter violemment pendant une minute. Laisser reposer en position verticale pendant 30 minutes. Prélever avec une pipette et verser dans un verre de montre la masse émulsionnée, sans aspirer le liquide sous-jacent. Déposer III gouttes de l'émulsion sur des lames de verre bien flambées et refroidies. Ajouter II à III gouttes

d'alcool absolu, mélanger et étaler en couche mince ; sécher à l'étuve et colorer par le procédé de *Fontana-Tribondeau*.

*
* *

H. — Analyse microbiologique des selles.

Examiner directement, entre lame et lamelle, une goutte de dilution de selle dans l'eau stérile, ou après coloration : thionine, Gram, Ziehl-Nielsen.

Pour la recherche des bacilles typhique et paratyphique, dysentérique, du vibrion cholérique et de l'amibe dysentérique, voir les chapitres relatifs à ces microbes.

Technique de Calmette et Guérin pour la recherche du bacille tuberculeux. — On pèse dans un flacon d'Erlenmeyer 30 grammes de matière que l'on mélange ensuite avec 55 centimètres cubes d'eau stérile et 15 centimètres cubes d'antiformine. On agite à plusieurs reprises et on laisse en contact pendant 3 ou 4 heures, puis on centrifuge, on décante, on recueille le dépôt dans un vase stérile et on le dilue dans 8 à 10 centimètres cubes d'eau salée physiologique. On le filtre à travers 2 ou 3 doubles de gaze stérile et on l'inocule à la dose de 2 à 3 centimètres cubes sous la peau, à 3 ou 4 cobayes, au voisinage de la région inguinale

Technique de Moreau. — Broyer dans un verre ou un mortier stériles 50 grammes environ de matières, en ajoutant peu à peu de la solution de chlorure de sodium à 25 p. 100, jusqu'à ce que la masse devienne semi-liquide. On filtre sur gaze et on répartit le filtrat dans des tubes à centrifuger qu'on remplit jusqu'aux deux tiers. Chacun de ces tubes reçoit ensuite 2 centimètres cubes d'un mélange d'éther sulfurique et de ligroïne à parties égales On agite et on centrifuge pendant 10 minutes à 4.000 ou 5.000 tours. Les micro-organismes étrangers sont en grande partie détruits par l'éther, et les bacilles tuberculeux sont rassemblés à la limite de séparation des liquides. On les recueille avec l'anse de platine pour les étaler sur lames et les inoculer au cobaye.

CHAPITRE XXX

CHARBON BACTÉRIDIEN. — CHOLÉRA DES POULES. — PASTEURELLOSES. — ROUGET DU PORC.

A. — **Charbon bactéridien.**

Examen à l'état frais : bâtonnet immobile, non cilié, formes en bambou. Capsulé seulement dans les humeurs de l'organisme ou dans les cultures en sérum liquide, en liquide cérébro-spinal ou autres milieux riches en albumines. Spores réfringentes hors de l'organisme vivant.

Coloration. — Toutes les couleurs basiques. Prend le Gram. Coloration des capsules par la safranine ou par la méthode de Friedlander : violet de gentiane phéniqué, décoloration par l'alcool à 90° et lavage à l'eau distillée ; ou bien par la méthode de Jones : fixation à la flamme après séchage à l'air; coloration à chaud pendant 15 à 30 secondes par une solution aqueuse à 2 p. 100 de violet de gentiane ; lavage rapide à l'eau ; passage pendant 6 à 10 secondes dans l'eau acidulée par l'acide acétique à 1 ou 2 p. 100 ; dernier lavage à l'eau et examen direct au microscope.

On peut encore faire la double coloration des bacilles et des capsules d'après le procédé de Kaufmann on traite la préparation pendant quelques minutes par le bleu de méthylène alcalin de Löffler, on lave rapidement à l'eau et on plonge pendant 4 minutes dans une solution à 0,25 p. 100 de protargol. La préparation ainsi différenciée est ensuite colorée pendant 5 à 10 secondes par un bain de fuchsine de Ziehl diluée à 1 p. 20 dans l'eau. Après un dernier lavage on examine. Les bacilles apparaissent colorés en bleu foncé, les capsules en rouge.

La coloration du sang se fait le mieux par le Gram-éosine. Celle des spores dans les cultures se fait par les méthodes indiquées au chapitre VII (C).

Culture. — Elle s'obtient sur tous les milieux usuels légèrement alcalins ; pH limites = 6,0-8,5. pH optimum = 7,0-7,4.

Température optimum 30 à 40°, mais la croissance a lieu à partir de 15° jusqu'à 43°. La sporulation n'a plus lieu entre 42 et 43°. Le bouillon reste limpide. Les bactéridies y poussent en flocons formant de légères houppes qui tombent au fond des vases et se dissocient facilement par agitation.

Gélatine : liquéfiée, développement en méduse ou en branche de sapin.

Sérum coagulé : lentement liquéfié. Lait : coagulé, puis digéré.

Ne forme pas d'indol.

Les cultures en bouillon contiennent une hémolysine qui dissout les hématies de lapin ou de mouton et aussi, mais un peu moins vite, celles des autres mammifères

Détruit le glycogène *in vivo* et *in vitro* Saccharifie légèrement l'amidon et attaque le glucose en formant des acides lactique et acétique.

Produit dans les milieux de culture un ferment protéolytique très actif qu'on sépare en tuant les bactéridies par le toluol et en centrifugeant le liquide (sans filtrer).

Les bacilles non sporulés sont tués par 40 minutes de chauffage à 55° dans les cultures ; par 1 heure de chauffage à 50-55° dans le sang frais.

Les spores sont tuées seulement après 10 minutes à 95° dans la vapeur d'eau, après 3 minutes à 100°

Recherche de la bactéridie charbonneuse dans les produits organiques. — Les prélèvements de sang et de fragments viscéraux doivent être effectués le plus tôt possible après la mort pour éviter les infections secondaires, par le vibrion septique particulièrement. On examinera les frottis colorés suivant une des méthodes indiquées ci-dessus et on cherchera à identifier la bactéridie par les cultures en gélose et bouillon et par inoculation sous-cutanée ou intracutanée au cobaye.

Pour l'envoi de produits charbonneux, il est recommandé de prélever un métacarpe ou un métatarse dont la moelle osseuse renferme des bactéridies à l'état de pureté, même lorsque les cadavres dont ils proviennent sont en voie de putréfaction. Il suffit ensuite de scier l'os perpendi-

culairement à sa longueur, de cautériser à la flamme ou au fer rouge la surface de section et d'aspirer avec une pipette stérile une petite quantité de moelle qu'on ensemence dans un tube de bouillon ou qu'on étale à la surface d'un tube de gélose.

Coloration des coupes d'organes d'animaux charbonneux. — Enlever la paraffine avec le xylol, puis alcool absolu, eau. Brasiline, eau ordinaire, solution aqueuse de violet de gentiane, liquide de Lugol, alcool acétone presque à décoloration, eau ordinaire, aurantia, alcool à 50°, 100°, xylol, baume, lamelles.

Réaction de précipitation d'Ascoli. — On additionne les produits suspects finement broyés (rate, foie, etc.) de 4 à 5 fois leur poids d'eau physiologique et on fait bouillir pendant 5 minutes. On filtre à froid sur papier jusqu'à ce que le liquide devienne clair. Dans un petit tube à essai de 3 à 4 millimètres de diamètre, on verse 0 cc. 5 de sérum précipitant anticharbonneux, puis avec une pipette à effilure très fine, on ajoute dans le même tube 0 cc. 5 du filtrat précédent, en prenant la précaution d'appliquer l'extrémité de la pipette contre la paroi du tube pour que les liquides restent nettement superposés. Si les organes proviennent d'un animal mort de charbon, un trouble annulaire caractéristique se forme à la surface de contact des deux liquides.

*
* *

B. — Choléra des poules. Pasteurelloses.

Coloration. — Facile avec toutes les couleurs basiques, thionine phéniquée. Ne prend pas le Gram. Pôles plus colorés, centre clair (Pasteurella).

Culture. — Très facile dans les bouillons légèrement alcalins, bouillon de veau ou de poule qu'il trouble dans toute leur masse. En gélatine, ne liquéfie pas. Colonies petites, transparentes, en gouttes de rosée. Ne pousse pas sur la pomme de terre (caractère différentiel avec les microbes de la typhose aviaire). Le microbe du choléra des poules, comme la Pasteurella du lapin et les Pasteurella

humaines, ne pousse pas dans l'eau de levure. Pour les différencier on ensemencera un milieu liquide préparé de la manière suivante (Staub et Truche) :

Délayer 100 grammes de levure de boulangerie dans un litre d'eau de conduite en ajoutant l'eau peu à peu. Faire bouillir pendant 5 minutes. Filtrer sur papier double. Verser le filtrat dans un ballon et stériliser à 110°-112° pendant 15 minutes. Laisser déposer pendant 15 jours, décanter et répartir le liquide clair.

Ce milieu ne doit être ensemencé qu'à partir d'une culture sur gélose ou en bouillon. Le microbe de la typhose aviaire s'y développe abondamment, de même que le Bacterium coli ; la Pasteurella du choléra des poules ne s'y développe pas.

Pour l'ensemencement des produits organiques, il est préférable de prélever un os long, une patte désarticulée ou coupée au-dessus de l'articulation tibio-tarsienne. On sectionne transversalement l'os à l'aide d'un costotome ou d'un sécateur, on brûle à la flamme la surface de section et on plonge une pipette stérile dans le conduit osseux pour aspirer une petite quantité de moelle qu'on ensemence ensuite sur de la gélose Martin ou du bouillon Martin. On peut se contenter de plonger un fil de platine flambé dans la moelle et de le promener à la surface de la gélose inclinée. On porte ensuite à l'étuve à 37° (Truche).

Le virus, détruit en quelques minutes à 58°, résiste à la glycérine. On peut conserver virulents pendant plusieurs mois (surtout à la glacière) des fragments un peu volumineux de rate immergés dans la glycérine pure à 30° Bé .

Nota : C'est dans le filtrat d'une culture en bouillon du choléra des poules que Pasteur découvrit la première toxine soluble, en 1880.

*
* *

C. — Caractères généraux des pasteurelloses.

(*D'après Lignières.*)

Le groupe des Pasteurella, auquel appartient le microbe du choléra des poules, comprend une série d'autres

microbes pathogènes pour les animaux, principalement pour les rongeurs et les ruminants. (Septicémie du lapin, pneumo-entérites du mouton, de la chèvre, pleuro-pneumonie du buffle ou barbone Pasteurellose du porc (schweinseuche), pneumonie infectieuse du cheval, etc.

Tous ces microbes sont des cocco-bacilles prenant la coloration bipolaire, très polymorphes, immobiles, non sporulés, surtout aérobies ; non colorables par le Gram. Ils ne poussent pas sur la pomme de terre naturelle acide, ne coagulent pas le lait, ne donnent pas d'indol. Ils sont tous plus ou moins agglutinables par un pasteurella-sérum très actif, préparé par exemple avec la Pasteurella porcine de Preisz.

*
* *

D. — Rouget du porc.

Coloration. — Toutes les couleurs basiques. Thionine phéniquée. Prend le Gram.

Culture. — Aérobie. Immobile. En bouillon légèrement alcalin à 37°, trouble uniforme en 48 heures. Colonies floconneuses. L'addition de 2 p. 1.000 de glucose ou de liquide d'ascite favorise la culture.

En gélatine, par piqûre, développement rayonné en brosse à bouteilles, caractéristique. Pas de liquéfaction. Sur gélose, colonies petites, blanches ou grisâtres.

La culture sur pomme de terre ne réussit que dans le vide. Elle est peu abondante.

Virulent pour le porc, le lapin, la souris, le pigeon; cobaye et poules réfractaires. Virus tué par chauffage 30 minutes à 50°, en quelques minutes à 58°, exalté par passages sur le pigeon, atténué pour le porc par passages successifs sur le lapin.

CHAPITRE XXXI

STAPHYLOCOQUE. — STREPTOCOQUE. — PNEUMOCOQUE. — MÉNINGOCOQUE. — GONOCOQUE. — MICROCOCCUS MELITENSIS ET BACILLUS ABORTUS.

A. — **Staphylocoque.**

Coloration. — Prend le Gram, se colore également avec les couleurs basiques d'aniline, le brun de Bismarck, le vert malachite et aussi avec certaines couleurs acides, par exemple l'orange G ou l'aurantia en solution aqueuse concentrée.

Les coupes doivent être traitées par le picro-carmin et le Gram, ou bien d'abord par le Gram-Nicolle, puis par le carmin.

Culture. — Température opt. 24 à 38°, mais pousse encore à 6°.

Les milieux solides usuels conviennent parfaitement. Il est utile de les alcaliniser un peu L'optimum d'alcalinisation est de 6 cc. 8 de lessive normale de soude par litre, ajoutés à partir du point de neutralisation au tournesol. pH limites = 5,6 8,1. pH optimum = 7,2-7,6.

Le lait est coagulé.

Dans le bouillon-ascite, les cultures agglutinées poussent en amas.

La gélatine est liquéfiée assez rapidement (ferment trypsique).

Les pigments colorés se développent le mieux sur sérum de bœuf gélatiné, sans glycérine, et sur pomme de terre.

Les cultures sont tuées par 2 ou 3 heures de chauffage à 52-53°, en 10 minutes à 62°, en 5 minutes à 70°.

Le filtrat contient une *leucocidine* et une *hémolysine* [1].

Cette dernière est détruite par le chauffage à 65° et réapparaît à 100°. (*Landsteiner* et *von Rauchenbiehler*.)

*
* *

B. — Streptocoque.

La principale variété pathogène est le *Str. longus pyogenes*.

Coloration. — Par toutes les couleurs basiques d'aniline. Prend le Gram. Chaînettes plus ou moins longues, encapsulées dans les exsudats.

Culture. — Température opt. 24-38°. Très lente de 12 à 15°. Anaérobie facultatif. pH limites = 5,5-8,0. pH optimum = 6,2-7,0.

Gélose-peptone de Witte légèrement alcaline en tubes inclinés arrosée à sa surface de quelques gouttes de sang humain. Convient surtout pour l'isolement.

Gélose lactosée tournesolée. Fines colonies bleutées en 24 heures, surélevées légèrement au centre ensuite, avec bords sinueux. Virage en 24 heures.

Lait. Coagulé en 24-48 heures, avec tassement du caillot.

Bouillon sérum de Marmorek.

Bouillon fraîchement préparé et alcalin. 5 cc environ de lessive de soude par litre à partir de la neutralité.	1 p.
Sérum humain frais.	2 p.

ou bien :

Bouillon 2 p. Liquide d'ascite.	1 p.

ou bien :

Bouillon Martin 1 p. Sérum de cheval inactivé par 30° de chauffage à 58°. . .	1 p.

On mélange aseptiquement le sérum ou le liquide d'ascite

1. Pour la recherche des hémolysines des staphylocoques et streptocoques, voir la technique décrite à propos du choléra (chapitre xxxv).

au bouillon préalablement stérilisé à l'autoclave ou mieux au filtre Chamberland.

Isolement et identification des streptocoques des plaies de guerre.

Milieu d'enrichissement de Weissenbach (eau peptonée glucosée à l'albumine d'œuf ; alcaline) :

Eau.	100 cc.
Peptone Chapoteau.	4 gr.
Sel.	0 gr. 50
Glucose.	0 gr. 20
Albumine d'œuf alcalinisée par la soude et diluée à raison d'une partie de blanc d'œuf pour trois d'eau distillée. . . .	100 cc.

a) Gélose ordinaire en tubes inclinés.

c) Gélose de Veillon pour ensemencement anaérobie (voir chap. III et XL).

Les streptocoques pyogènes attaquent l'amidon soluble, le saccharose et le lactose en formant des acides. Ils n'attaquent pas l'inuline, ni la mannite, ni la glycérine. Le milieu de Salomon permet de les différencier des autres groupes de streptocoques (Str. mucosus) et des pneumocoques.

Milieu différentiel de Salomon

A 10 centimètres cubes de gélose nutritive à 3 p. 100, fondue à 58°, on ajoute 1 cc. 5 d'une solution d'amidon soluble à 10 p. 100 faite dans la teinture de tournesol, puis 5 centimètres cubes de liquide d'ascite frais, inactivé par 30 minutes de chauffage au bain-marie.

On mélange et on coule en boîtes de Pétri qu'on ensemence en étalant en surface une goutte de liquide au moyen d'un petit carré de papier glacé stérile.

On peut incorporer à ce même milieu les divers sucres à la place de l'amidon.

(Pour la préparation de l'amidon soluble voir chapitre XVIII réactif de Tromsdorff.)

Hémolysine. — Très fragile, disparaît rapidement dans les cultures. On l'obtient le mieux en bouillon-sérum après 8 à 10 heures d'étuve. Elle est détruite par une demi-heure de chauffage à 55°. Son action est paralysée par 2 p. 100 de chlorure de sodium.

(Pour la technique de titrage voir chapitre XXXV, Choléra.)

Variété de streptocoques pathogènes.

S. longissimus (amygdales de sujets sains).

S. conglomeratus (*Kurth*, amygdales de sujets sains).

S. brevis (non hémolysant, cavité buccale de sujets sains).

Le *S. mucosus* forme des capsules dans les milieux de culture non albumineux. Il est beaucoup plus gros que le pyogène et pousse mieux dans le liquide d'hydrocèle coagulé ou sur gélose ascite. Cultivable dans le bouillon à la bile. Il est surtout pathogène pour la souris. On le trouve dans certaines otites, parotidites, etc. Il ne produit pas d'hémolysine et il attaque l'inuline en produisant des acides.

Les entérocoques se différencient nettement des streptocoques en ce qu'ils ne sont jamais hémolytiques. Ils produisent une toxine très résistante à la chaleur.

*
* *

C. — Pneumocoque.

Coloration. — Par toutes les couleurs basiques d'aniline. Prend le Gram. Toujours encapsulé dans les tissus et les produits d'expectoration. La capsule se forme aussi dans les milieux de culture albumineux, le lait, le sérum coagulé, etc. Elle est décolorée par le Gram et colorable par l'éosine (voir technique de coloration des capsules, chapitre VII).

Culture. — Ne pousse pas à 20°. La gélatine ne peut donc pas être utilisée. Le milieu de choix est la gélose-peptone arrosée de sang de lapin ou de sang humain, ou le bouillon-sérum comme pour le streptocoque. pH limites = 7,0-8,3. pH optimum = 7,8.

Milieu de Salimbeni et d'Hérelle (liquide). — On fait digérer pendant 7 à 8 heures (pas plus), à 50°, des estomacs de porc dégraissés et hachés comme pour la préparation de la peptone de Martin. L'eau est d'abord portée vers 55°, on ajoute ensuite, par litre, 10 centimètres cubes d'HCl pur (22° Bé) et, en agitant, 300 grammes de hachis d'estomac. On règle la température vers 50°. Après 7 à 8 heures, on monte celle-ci à 80-90° afin de détruire la pepsine et d'arrêter la

digestion. La peptone ainsi obtenue se conserve, sans précautions, plusieurs semaines.

Pour préparer le milieu destiné à la culture du pneumocoque on rend la peptone légèrement alcaline au tournesol, par addition de soude, et on stérilise à 120°. On filtre sur papier Chardin mouillé et on ajoute 2 grammes de glucose. On stérilise après répartition vers 112° à 115°.

Pour conserver les pneumocoques virulents, le milieu suivant est excellent :

Milieu T (de Truche) liquide :

Peptone Chapoteau.	4 gr.
Chlorure de sodium	0 gr. 5
Glucose	0 gr. 2
Eau distillée.	100 cc.

Faire dissoudre à 80°. Alcaliniser légèrement jusqu'à réaction légèrement rose avec la phtaléine de phénol. Faire bouillir pendant 5 minutes, filtrer, répartir et stériliser 1/4 d'heure à 110°.

Il est bon, pour les premières cultures, d'ajouter à ce milieu 1/3 de liquide d'ascite et, pour conserver la virulence, d'ajouter au milieu initial 2/3 de gélatine à 15 p. 100 dissoute dans de l'eau physiologique et alcalinisée.

Garder les cultures à la glacière, en tubes scellés.

Gélose T. — Même composition que le milieu T liquide. On ajoute 20 grammes de gélose par litre. Après dissolution de la gélose, on alcalinise jusqu'à virage légèrement rose de la phénolphtaléine. On répartit en tubes sans filtrer et on stérilise à 110° pendant 20 minutes. On laisse les tubes en position droite pendant 30 minutes dans l'autoclave chaud ouvert, puis on les incline comme les tubes de gélose ordinaire.

Nota. — Les pneumocoques virulents sont solubles dans la bile (0 cc 1 à 0 cc. 2 de bile de lapin dans 2 centimètres cubes de culture de 24 heures en bouillon ou d'émulsion de culture sur gélose), le milieu s'éclaircit en quelques minutes. Le taurocholate de soude, en solution à 10 p 100 dans l'eau salée physiologique stérilisée, a la même action à la dose de 1 volume pour 100 volumes de culture.

Milieux différentiels.

Milieu de Hiss	Sérum de bœuf. . . .	1 vol.
	Eau distillée.	2 vol.

Ajouter 1 p. 100 de teinture de tournesol à 5 p. 100, chauffer à 100°, filtrer. Ajouter 1 p. 100 d'inuline.

Stériliser par chauffage discontinu à 100°.

Le pneumocoque fermente l'inuline Le milieu rougit et se coagule. Le streptocoque ne fermente pas.

Conservation de la virulence. — *Procédé à la gélatine* (*M. Nicolle, Cotoni* et *Truche*). — Dans un litre de milieu T chauffé au bain-marie, faire dissoudre 150 grammes de gélatine portée à 55°, ajouter un blanc d'œuf ; alcaliniser ; chauffer 1/4 d'heure à 115°, filtrer, répartir en tubes ; stériliser pendant 20 minutes à 110°. Au moment de l'emploi, on fait fondre un tube de gélatine T au bain-marie et on y introduit la culture à conserver dans la proportion de 2 parties de gélatine pour une de culture. On mélange intimement en roulant le tube entre les mains et on porte à la glacière. Les microbes conservent ainsi leur vitalité et leur virulence pendant plusieurs mois. Pour les repiquer, il suffit de fluidifier la gélatine à 37° et d'ensemencer 2 à 3 centimètres cubes de son contenu dans un tube de milieu T.

Séro-agglutination (*M. Nicolle*). — Centrifuger une culture en bouillon T de 16 heures. Emulsionner le culot dans l'eau chlorurée sodique à 10 p. 1.000, à raison de 1 centigramme de germes par centimètre cube de liquide. Verser, dans une série de petits tubes à essai stériles, de 4 à 5 millimètres de diamètre, 1 centimètre cube d'émulsion et ajouter dans chacun d'eux des doses décroissantes de sérum : 1/20, 1/50, 1/100, 1/200 de centimètre cube. Boucher à l'ouate, agiter pendant 5 minutes. Si l'agglutination n'est pas immédiate, laisser les tubes à la température du laboratoire pendant 12 heures et lire les résultats.

Les pneumocoques se répartissent en agglutinables (43 %) ; hyperagglutinables (agglutinables par le sérum normal frais) (7 %) ; inagglutinables par les méthodes ordinaires (45 %) mais agglutinables après avoir été traités par la méthode suivante de *Porgès* : ajouter 1/10 d'HCl normal à 10 centimètres cubes d'émulsion de pneumocoques. Plonger 5 minutes dans l'eau bouillante, refroidir à l'eau courante, neutraliser avec 1/10 de NaOH normale. Répartir et opérer comme précédemment. Selon les échantillons, il est parfois nécessaire de porter de 2/10 à 5/10 la quantité d'HCl.

*
* *

D. — Méningocoque.

Coloration. — Bleu Löffler ou bleu Borrel. Ne prend pas le Gram. Les préparations faites avec le dépôt centrifugé de liquide cérébro spinal prélevé par ponction lombaire montrent la plupart des éléments microbiens inclus dans les leucocytes. Le méningocoque se trouve souvent associé au *Diplococcus crassus* ou *pseudo-méningocoque* de *Jaeger*, qui est plus épais, plus arrondi, et qui reste coloré par le Gram. Le méningocoque vrai ne peut être différencié des paraméningocoques que par l'étude complète de ses diverses réactions biologiques.

Milieux de culture. — Température optimum 37°. Ne se développe pas au-dessus de 22°.

Bouillon ascite. — 3 volumes de bouillon, 1 volume d'ascite. Le méningocoque ne commence à troubler ce milieu que vers le 5e ou le 6e jour. Voile mince à la surface.

Gélose-ascite.

Bouillon gélosé.	3 vol.
Ascite.	1 vol.

Faire le mélange à la température de 50°. Couler en boîtes de Pétri. Laisser solidifier.

On ensemence ces plaques directement au lit du malade, avec les tampons d'ouate qui ont servi à prélever les exsudats nasopharyngés ; on les porte 36 heures à l'étuve, puis on repique les colonies sur les milieux différentiels. S'il s'agit d'un liquide de ponction lombaire, on étale sur ce milieu une partie du dépôt centrifugé. Les colonies du méningocoque se développent en 20 à 24 heures à 37°.

Si l'on ne peut se procurer du liquide d'ascite, on emploiera le milieu suivant, préconisé par *Sacquépée* et *Delater* :

On mélange, dans un vase d'Erlenmeyer préalablement gradué, deux blancs d'œuf entiers. On y ajoute 3 fois leur volume d'eau distillée et 0 cc. 5 p. 100 centimètres cubes d'une solution de soude caustique à 10 p. 100. On stérilise

à l'autoclave à 115° pendant 15 minutes. On ajoute 1 partie de ce liquide à 5 parties de bouillon gélosé neutre stérile, fondu à 55°, et on coule en plaques.

M. Nicolle, *E. Debains* et *C. Jouan* recommandent l'emploi de la gélose Truche (ou gélose T) comme milieu habituel.

Pour préparer la gélose-Martin-sérum (formolé), on ajoute, à 500 centimètres cubes de sérum de cheval, 1 centimètre cube de formol du commerce, on mêle, on verse après quelques instants 1 centimètre cube d'ammoniaque à 22° Bé pour neutraliser la formaldéhyde, on étend de deux parties d'eau *distillée* et on stérilise pendant 15 minutes à l'autoclave à 100°. Le milieu contientainsi une partie de sérum pour 9, ce qui suffit.

La gélose se prépare en dissolvant dans 1 litre d'eau chauffée à 80°, 40 grammes de peptone Chapoteau, 5 grammes de sel et 2 grammes de glucose. On ajoute 20 grammes de gélose, on alcalinise, on stérilise à l'autoclave, on filtre, puis on répartit et on stérilise une dernière fois. On laisse pendant quelques jours au repos sans capuchonner pour se débarrasser de l'eau de condensation.

Après 24 heures, sur ce milieu, le méningocoque donne des colonies rondes, humides, un peu surélevées, grisâtres.

Dans le bouillon préconisé par *Salimbeni* et *d'Hérelle* pour le pneumocoque, le méningo pousse également très bien, et reste vivant pendant une quinzaine de jours.

Presque tous les méningos, d'après *M. Nicolle* et ses collaborateurs, attaquent le glucose, le maltose et, moins énergiquement, le lévulose.

Pour l'isolement, on ensemence, sur gélose-sérum et en milieu de Salimbeni et d'Hérelle, le culot de centrifugation du liquide céphalo-rachidien prélevé par ponction lombaire.

Milieu MM. (Panse glucosée) — Prendre par exemple un litre de peptone Martin obtenue par digestion courte (6-8 heures) ; elle est fortement acide. Alcaliniser, précipiter par chauffage à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°. Filtrer sur papier, ajouter 2 grammes de glucose par litre, répartir et stériliser par chauffage à l'autoclave 15 minutes à 112-115°.

Gélose au placenta (de Kutscher). — Préparer un litre de

bouillon en faisant macérer 500 grammes de placenta haché dans 1 litre d'eau :

Ajouter :

Gélose	2,5 p. 100
NaCl	0,5
Glucose	1
Nutrose	2
Peptone Chapoteau	2

A 3 volumes de cette gélose, légèrement alcalinisée et stérilisée, ajouter 1 volume de sérum de bœuf inactivé par chauffage à 60°. La gélose et le sérum stériles doivent être portés l'un et l'autre à la température de 50° au bain-marie avant d'en faire le mélange.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE L'INFECTION MÉNINGOCOCCIQUE. — *Recherche du méningocoque.*

A) *dans le liquide céphalo-rachidien.* — Le liquide céphalo-rachidien, prélevé par ponction lombaire, est centrifugé pendant 15 à 20 minutes.

Examen microscopique. — Décanter le liquide clair. Avec une pipette effilée, prélever quelques gouttes du culot de centrifugation, et les étaler sur plusieurs lames de verre. Dessécher, fixer par la chaleur ou l'alcool éther ; faire un Gram et colorer le fond par le Ziehl dilué.

Le méningocoque se présente sous la forme de cocci en grains de café intraleucocytaires ou libres, ne prenant pas le Gram.

Isolement du méningocoque.

1° *Procédé classique.* Ensemencer abondamment le culot de centrifugation sur gélose ascite, en tubes ou boîte de Pétri. Mettre à l'étuve à 37° pendant 24 heures, examiner les colonies qui ont poussé.

2° *Procédé de Tribondeau.* — Après la ponction lombaire, prélever de 5 à 10 centimètres cubes de liquide céphalo-rachidien. Le reste sera centrifugé pour l'examen microscopique et l'ensemencement du culot.

Couler de la gélose ascite dans une grande boîte de Pétri. Lorsqu'elle est prise, verser sur le milieu les 5 à 10 centimètres cubes de liquide céphalo-rachidien qui ont été prélevés. La boîte de Pétri ainsi ensemencée est placée à plat à l'étuve à 37°. Au bout de quelques heures, incliner

légèrement la boîte de façon que le liquide céphalo-rachidien laisse à découvert une bonne moitié de la surface du milieu.

Vers la 18e heure, examiner les colonies de méningocoques qui ont poussé dans la zone sèche, le plus souvent à la limite du liquide.

B) Dans le mucus rhino-pharyngé. Le mucus doit être prélevé dans le rhino-pharynx avec l'écouvillon d'ouate stérile :

Déposer une parcelle de mucus recueilli sur une boîte de Pétri contenant de la gélose ascite. Avec une pipette coudée, l'étaler sur la boîte. Sans la recharger on peut faire une 2e et une 3e boîte semblables.

C) Dans le sang. 5 centimètres cubes de sang ensemencés dans un ballon de 250 centimètres cubes de bouillon ascite ou d'un autre milieu favorable. Isoler ensuite sur gélose ascite

IDENTIFICATION. — Les épreuves d'identification permettent de reconnaître : 1° si le germe isolé est un méningocoque ; 2° à quel type de méningocoque il appartient.

Epreuve des fermentations sucrées par le milieu différentiel au rouge neutre (Dopter, R. Koch).

Dans une série de matras contenant chacun 75 centimètres cubes de bouillon gélosé à 3 p. 100 fondu au bain-marie à 55°, on fait dissoudre 1 gramme de chacun des sucres suivants (chaque sucre dans un matras différent) :

Glucose.
Saccharose.
Maltose.
Lactose.

On chauffe 20 minutes à l'autoclave à 105°, on laisse refroidir à 50°, on ajoute à chaque matras 25 centimètres cubes de liquide d'ascite et 1 centimètre cube de solution aqueuse de rouge neutre à 1 p. 100. Le milieu prend une couleur orangée. On le maintient au bain-marie pendant 1 heure. Au bout de ce temps, un précipité se forme. On agite les matras et on coule chaque milieu en boîtes de Pétri. Sous une faible épaisseur, il prend une teinte jaune et rougit nettement sous les colonies qui fermentent les sucres. Voici les résultats de la réaction avec le méningocoque et

avec les principaux microbes dont il s'agit de le différencier :

	Glucose	Saccharose	Maltose	Lactose
Méningocoque et Paraméningocoque.	+	0	+	0
Diplococcus crassus.	+	+	+	+
Microc. catarrhalis.	0	0	0	0
Diploc. pharyngis flavus I. . . .	+	0	+	0
» » » II . . .	+	0	+	0
» » » III. . . .	+	0	+	0
Gonocoque.	+	0	0	0

Diagnostic par la séro-agglutination. — On prend 3 tubes à essai et on verse dans l'un, 1 centimètre cube d'une dilution à 1 p. 100 de sérum anti-méningo (non chauffé), dans les deux autres, respectivement, 1 centimètre cube de dilution à 1. p. 100 de sérum de cheval normal (non chauffé et 1 centimètre cube d'eau salée physiologique à 7 gr. 5 p. 1.000.

On émulsionne dans chaque tube 1 anse de culture ou d'émulsion concentrée d'une colonie âgée de 24 heures du méningocoque à identifier. On porte à l'étuve à 37°. L'agglutination est complète au bout de quelques heures (24 heures au plus) dans le premier tube s'il s'agit d'un méningocoque. Beaucoup de pseudo-méningocoques s'agglutinent spontanément et presque instantanément dans l'eau salée physiologique. C'est le cas en particulier pour le Microc. catarrhalis.

Il est souvent commode d'effectuer la réaction d'agglutination directement sur lames (*S. Costa*) :

On dépose au centre d'une lame deux gouttes d'eau salée physiologique dans lesquelles on émulsionne, avec une anse de platine, un fragment de colonie suspecte. On y ajoute une anse de platine (représentant environ 1/25 de goutte) de sérum agglutinant. On mélange fortement pendant quelques secondes, puis on recouvre d'une lamelle et on examine. Si, au bout de deux à trois minutes, l'agglutination ne se produit pas, le séro-diagnostic est négatif. On fait d'ailleurs une épreuve de contrôle avec du sérum normal et une autre avec de l'eau salée physiologique.

M. Nicolle, E. Debains et C. Jouan ont signalé l'existence de plusieurs types de méningocoque (A, B, C) plus spécifiquement agglutinables par un sérum.

Dans la région parisienne, le type B est le plus commun.

Pour déterminer chaque type, on cultive les germes sur la gélose Truche (voir ci-dessus) et, après 24 heures d'étuve, on les émulsionne dans de l'eau physiologique additionnée de 1/20 de bouillon Martin, à raison de 1 centimètre cube de microbes pour 20 centimètres cubes de liquide. On prépare 4 groupes de 4 tubes contenant 1 centimètre cube d'émulsion et on verse respectivement pour chaque groupe 1/20, 1/50, 1/100, 1/200 de centimètre cube de chaque sérum anti A, B et C ou de sérum équin normal (il est exceptionnel qu'on soit obligé d'employer plus de 1/200 de centimètre cube de sérum spécifique). On agite environ 10 minutes et on note le taux auquel l'agglutination se produit dans chaque tube.

Procédés indirects : Précipito-diagnostic (Vincent) pour le liquide de ponction lombaire. — Le liquide centrifugé et décanté est versé dans un tube stérile A 50 gouttes de ce liquide on ajoute 1 à 3 gouttes de sérum antiméningo non chauffé. Boucher le tube au caoutchouc. Préparer un tube de contrôle avec le liquide céphalo-rachidien seul. Porter à l'étuve à 37° ou mieux au bain-marie à 55°. Au bout de 15 à 16 heures, le tube contenant le sérum anti est opalescent si le méningocoque est en cause. L'autre tube reste généralement limpide. Toutefois la réaction n'est pas rigoureusement spécifique. Elle est souvent positive avec le paraméningocoque et avec le pneumocoque.

Recherche de l'agglutination avec un méningocoque type. — Elle s'effectue, avec le sérum du malade suspect, vis-à-vis d'une culture type de méningocoque entretenue au laboratoire. Elle doit être positive à 1 p. 40 ou à 1 p. 50. La réaction n'apparaît qu'au 8e ou 10e jour de la maladie, ce qui diminue beaucoup son importance.

Fixation du complément. — Elle se fait selon la technique des réactions de Bordet-Gengou (voir chap. xxii), soit avec le sérum inactivé du malade et un méningocoque de culture-type entretenu au laboratoire, soit en mettant en présence 1 centimètre cube de liquide céphalo-rachidien comme antigène et du sérum antiméningococcique.

Epreuve du péritoine. — On prend deux cobayes de 250 à 300 grammes. L'un reçoit, dans le péritoine, 1/2 centimètre cube de sérum antiméningo non chauffé ; l'autre

1/2 centimètre cube de sérum normal de cheval non chauffé. Après 24 heures on injecte à tous deux, dans le péritoine, 1/6 environ d'une culture sur gélose âgée de 24 heures émulsionnée dans l'eau physiologique, 25 minutes plus tard on prélève, à la pipette capillaire, par ponction (l'animal étant tenu par un aide, le ventre en bas, saillant transversalement) quelques gouttes d'exsudat qu'on étale sur lame qu'on sèche et qu'on fixe par l'alcool éther. Colorer par thionine phéniquée. Les méningos vrais ont disparu ou sont à peine visibles dans l'exsudat du premier cobaye, tandis qu'ils se montrent nombreux et bien colorés dans celui du second. S'il s'agit de paraméningocoques, l'exsudat du premier cobaye est aussi riche en cocci bien colorés que celui du second.

Epreuve de grysez (inoculation intra-rachidienne au cobaye). — On inocule directement dans la cavité rachidienne, au niveau de la 4e ou 5e vertèbre lombaire, par ponction d'arrière en avant, avec une forte aiguille de seringue de Pravaz, 0 cc. 5 du liquide céphalo-rachidien suspect, non centrifugé. S'il s'agit de méningite cérébro-spinale à méningo, la mort survient entre 2 et 24 heures avec une hypothermie très caractéristique. Les animaux préalablement vaccinés par le sérum antiméningo ne succombent pas et n'ont pas d'hypothermie.

*
* *

E. — **Gonocoque.**

Température opt. 37°. Ne pousse pas au-dessus de 30°.

Coloration. — Elle s'obtient très aisément avec les méthodes simples. La plus recommandable est celle de *Maurice Nicolle* à la thionine phéniquée ou bien le mélange de *Pick et Jacobsohn*, qu'on doit préparer au moment de s'en servir avec des solutions mères :

Eau.	20 cc.
Sol. de fuchsine de Ziehl.	XV gouttes.
Sol. alcool. sat. de bleu de méthylène. .	VIII gouttes.

Colorer 30 secondes. Laver. Sécher.

On peut aussi employer la méthode de Pappenheim, qui est très élégante. Elle consiste à colorer la préparation pendant 1 minute avec une solution de vert de méthyle et de pyronine faite de la manière suivante :

On met dans un flacon 0 gr. 15 d'alcool, 20 centimètres cubes de glycérine, 100 centimètres cubes d'eau phéniquée à 0,5 p. 100. Ce liquide est d'une belle couleur bleu-violet. On le fait agir sur les préparations (fixées par simple dessiccation lente et passage à travers la flamme) pendant 2 à 5 minutes, puis on lave à l'eau et on sèche. Les gonocoques apparaissent rouges et les noyaux cellulaires bleus.

La méthode de Lesscynski est aussi très bonne. On colore à la thionine phéniquée pendant 30 à 60 secondes, puis on lave à l'eau et on fait agir sur la préparation, pendant 1 minute, la solution suivante :

Sol. sat d'acide picrique dans l'eau. . .	1 vol.
Sol. aqueuse de potasse caustique à 1 p. 1.000.	1 vol.

Puis, on passe à l'alcool, on lave à l'eau, on sèche et on examine dans l'huile à immersion.

Les cellules sont jaune paille, les noyaux rouge violacé, les gonocoques violet noir, les autres microbes jaunes ou rose rouge. Il y a toujours avantage à faire une préparation colorée au Gram pour déceler les cocci autres que le gonocoque, par exemple le synocoque de Ch. Nicolle, qui peuvent coexister avec celui-ci dans un pus uréthral. On fera alors un Gram-Nicolle et une coloration de contraste avec de la safranine ou du brun de Bismarck ou de la fuchsine de Ziehl.

Culture. — pH limites = 6,0 8,3, pH optim = 7,3. Pour isoler le gonocoque on peut se servir de bouillon ascite (1 partie de liquide d'ascite, 3 parties de bouillon ou de gélose peptonée légèrement alcaline), ou bien de la gélose au sérum de porc de Wassermann.

Milieu gélosé de Wassermann :

Sérum de porc.	150 cc.
Eau distillée.	150 cc.
Glycérine.	20 cc.
Nutrose (sol. à 2 p. 100).	9 cc.

Faire ce mélange dans un vase d'Erlenmeyer et le porter à l'ébullition en agitant constamment, puis ajouter,

après refroidissement à 55°, parties égales de gélose peptonée à 2 p. 100 fondue, et couler en boîtes de Pétri.

Les colonies se développent bien en 24 heures à 37°. On peut encore employer le milieu suivant :

Milieu de Sabouraud et Noiré : Faire bouillir pendant 5 minutes 1 litre de lait frais Précipiter la caséine par addition de 2 centimètres cubes d'HCl et recueillir le sérum par simple passage sur un tamis recouvert de coton hydrophile.

Ajouter moitié du volume d'eau. Neutraliser avec solution de soude à 10 p. 100. Porter à l'autoclave à 120° pendant 10 minutes. Filtrer. Ajouter :

1 p. 100 de peptone.
1 p. 100 de glucose ou saccharose.
0.30 p. 100 d'urée.
1.60 p. 100 de gélose.

Faire dissoudre à l'autoclave. Filtrer sur Chardin. Répartir en tubes. Stériliser 10 minutes à 110°.

Le milieu de Ch. Nicolle est aussi très recommandable. Il permet de cultiver le gonocoque et le synocoque pour la préparation du vaccin mixte :

Bouillon de viande.	100 cc.
Urée.	0 gr. 40
Glucose pure.	2 gr.
Phosphate d'ammoniaque.	0 gr. 05
Sel marin.	1 gr.
Gélose	1 gr. 5

Plus, pour le gonocoque, 0 cc. 5 de sérum de lapin pour 5 centimètres cubes de milieu.

Après 24 heures, retirer les cultures de l'étuve.

Pour la préparation de son vaccin mixte, Ch. Nicolle émulsionne les cultures dans une solution à 7 p. 1.000 de fluorure de sodium, stérilisée par filtration à la bougie Chamberland. On lave et on centrifuge plusieurs fois les microbes avec la solution fluorée. Finalement on mélange 1 partie de gonocoques à 9 parties de synocoques et on titre à 500 millions de microbes par centimètre cube.

48 heures de séjour à la glacière suffisent pour détruire la vitalité des microbes.

Nota. — Les cultures de gonocoques sont très sensibles à la dessiccation.

La plupart perdent leur vitalité sur les milieux artificiels en 5 à 9 jours. Cependant, ensemencées sur gélose-ascite en tubes droits (en culots) et maintenues à l'étuve constamment entre 35 et 39°, bien capuchonnées pour éviter la dessiccation, on peut les conserver vivantes pendant plus d'une année (*V. Morax*).

Différenciation avec le méningocoque. — Sur gélose ascite additionnée de teinture de tournesol et de 2 p. 100 de maltose, le méningocoque donne des colonies rouges ; celles de gonocoque restent incolores.

*
* *

F. — Micrococcus melitensis.

Coloration. — Par toutes les couleurs basiques d'aniline. Ne prend pas le Gram.

Culture. — Elle est toujours lente. Température optimum 37°. Sur plaques ou tubes de gélose, ressemble à des gouttes de rosée après 48 à 72 heures (sur sérum coagulé, colonies blanchâtres, humides).

Sur gélatine, n'apparaît qu'après 5 jours à 22°. Pas de liquéfaction.

En bouillon légèrement alcalin, léger trouble après 4 heures, mais la culture ne se développe bien qu'en 8 jours. Amas peu denses au fond des tubes. Ne fermente pas les sucres. Tué par 10 minutes de chauffage à 58°.

Sérodiagnostic. L'épreuve doit toujours être effectuée avec le sérum des malades chauffé 30 minutes à 56° pour éliminer les agglutinines non spécifiques. Employer, autant que possible, des races de M. melitensis non agglutinables par les sérums normaux.

Pour éviter les contaminations fréquentes de laboratoires avec le M. melitensis on peut se servir aussi du bacille de Bang ou bacille de l'avortement épizootique. Il se comporte exactement comme le M. melitensis dans les épreuves d'agglutination.

Si les résultats sont négatifs avec ces microbes, essayer le pouvoir agglutinant du sérum sur une race de M. paramelitensis.

En prenant les précautions indiquées, les titres d'agglu-

tination supérieurs à 1 p. 250 permettent d'établir le diagnostic.

Le sérum reste agglutinant après la convalescence pendant longtemps, parfois après 10 ans.

Diagnostic par l'intradermoréaction. — Ce procédé, proposé par Burnet, consiste dans l'injection d'une goutte du filtrat d'une culture de M. melitensis en bouillon, âgée d'un mois (*Melitine*). La culture est filtrée sur bougie Chamberland L. A la la suite de l'injection, on voit, à partir de la sixième heure, une réaction locale caractérisée par de l'œdème et de la rougeur. Cette réaction ne se produit que chez les sujets infectés par le M. melitensis.

Hémoculture. — Le diagnostic doit toujours être appuyé d'une hémoculture portant sur 5 centimètres cubes de sang qu'on prélève aseptiquement dans une veine, au moyen d'une seringue contenant 8 à 10 gouttes de solution à 10 p. 100 de citrate de soude stérilisée et qu'on projette aussitôt dans un gros tube de bouillon nutritif.

Le tube est porté à l'étuve, et à partir du 3e jusqu'au 10e jour, on en prélève, à la pipette, quelques gouttes pour ensemencer des tubes de gélose et isoler des colonies dont on vérifie la pureté.

L'urine des malades, surtout à partir du 15e jour et pendant la convalescence, contient fréquemment des mélitocoques qu'on peut cultiver en partant d'urine recueillie aseptiquement à la sonde.

*
* *

G. — **Bacillus abortus**. (Avortement épizootique.)

Morphologiquement, rien ne distingue le *bacille de l'avortement épizootique* du *Micrococcus melitensis*.

Les cultures sont identiques ; elles brunissent régulièrement ; cette propriété est plus marquée pour le coccobacille de Bang.

Les deux microbes développent dans le bouillon une alcalinité qui est la même ; tous deux décomposent l'urée et l'asparagine ; ni l'un ni l'autre n'attaquent les sucres.

Le sérum des individus atteints de fièvre ondulante et le

sérum des animaux (chèvres, cobayes) infectés par le melitensis agglutinent au même titre le *melitensis* et l'*abortus*.

Les cobayes infectés avec le melitensis sont sensibles à l'intradermoréaction à l'*abortine* comme ceux qui ont été inoculés avec l'abortus répondent à l injection de *melitine*.

Si l'on excepte l'action pathogène pour l'homme, rien ne permet, en l'état actuel de nos connaissances, de distinguer Micrococcus melitensis de Bacillus abortus.

Le sérum des vaches infectées agglutine le Bacillus abortus à un taux variable de 1 p. 100 à 1 p. 10.000. Le diagnostic de l'infection peut être fait par l'épreuve de l'agglutination.

CHAPITRE XXXII

TECHNIQUES SPÉCIALES A QUELQUES MICROBES PATHOGÈNES.

A. — Bacille pyocyanique (*Gessard*).

Très polymorphe. Mobile, 1 seul cil. Non sporulé.

Coloration. — Par toutes les couleurs basiques. Ne prend pas le Gram.

Culture. — Température opt. 20-38°. pH limites : 5,6-8,0 ; pH optimum 6,6-7,0.

Se développe bien sur tous les milieux usuels peptonés. Sur gélatine, donne des colonies bleu verdâtre, fluorescentes, lentement liquéfiantes. Sur gélose, il forme un pigment vert bleuâtre qui pénètre peu à peu toute la masse, brunit en vieillissant et donne naissance à des cristaux en forme d'aiguilles.

Il pousse abondamment sur bouillon alcalin en formant, à la surface, une membrane mucilagineuse qui s'épaissit peu à peu et reste flottante dans la masse liquide. Il y développe une odeur aromatique assez intense, rappelant celle des fleurs de jasmin ou de tilleul. A la longue, le milieu brunit et les bacilles s'autolysent. Cette autolyse se continue et s'achève si l'on ajoute au bouillon, du chloroforme ou du toluol.

Le lait est coagulé et bientôt le coagulum est digéré, dissous et peptonisé.

Le b pyocyanique acidifie les milieux glucosés mais ne les fermente pas. Il est très fortement dénitrifiant, décompose les nitrates et aussi les nitrites en dégageant de l'azote.

Le milieu de culture proposé par Gessard convient le mieux à l'étude des propriétés très curieuses de ce microbe :

Gélose hachée en petits morceaux. . . .	12 gr 50
Peptone.	5 gr.
Eau.	250 cc.
Glycérine	10 gr.

On dissout la peptone dans l'eau chaude, on ajoute la glycérine puis la gélose. On fait fondre à 100° dans l'autoclave non boulonné et on répartit en tubes, sans filtrer. Stériliser 30 minutes à 115° et laisser refroidir les tubes inclinés

Dans ce milieu le bacille produit avec intensité son pigment bleu et certaines variétés y produisent un pigment jaune verdâtre puis rouge vif (vin ou groseille), ou un pigment noir (variétés érythrogènes et var. mélanogènes).

Dans le blanc d'œuf pur, liquide (prélevé aseptiquement par ponction de l'œuf à travers la chambre à air et réparti en tubes à essai stériles), il ne donne que du pigment vert fluorescent.

Le pigment bleu (*pyocyanine*) est soluble dans le chloroforme. On peut l'extraire en agitant, avec quelques gouttes de chloroforme, un tube de culture en bouillon peptoné. Le pigment vert fluorescent est insoluble dans le chloroforme et dans l'alcool, soluble dans l'eau.

La pyocyanine cristallise (par évaporation du chloroforme) en longues aiguilles bleues. Les acides dilués (HCl) la rougissent tandis que les substances réductrices (H^2S) la transforment en leucobase jaunâtre ; les alcalis la bleuissent de nouveau.

Les cultures de b. pyocyanique contiennent un ferment lipolytique très actif, une hémolysine thermostabile liée à la présence de lipoïdes et qui n'est pas susceptible de jouer le rôle d'antigène, une catalase qui décompose l'eau oxygénée, un ferment trypsique, un ferment lab, une caséase, une invertine et un ferment bactériolytique.

Cet ensemble constitue la *pyocyanase*. Celle-ci dissout la gélatine, la fibrine, la caséine, le sérum coagulé, et l'albumine d'œuf. Elle dissout aussi les bactéridies charbonneuses et tue rapidement les bacilles diphtériques, les pneumocoques, les staphylocoques, les streptocoques, les vibrions cholériques et les bacilles de la dysenterie.

B. — **Coqueluche** (*Bordet et Gengou*).

Très petit bacille aérobie, intra ou extracellulaire, ne prenant pas le Gram, immobile.

Il prend difficilement les couleurs. On le met cependant

en évidence par le bleu phéniqué de Kuhne, le bleu Borrel, le bleu de toluidine ou la thionine phéniquée, en prolongeant quelque peu l'action du colorant. Il se teint davantage aux pôles qu'au centre.

On le cultive sur gélose arrosée de sang humain ou mieux sur le milieu suivant de Bordet et Gengou :

Pommes de terre coupées en tranches. . .	100 gr.
Eau glycérinée à 4 p. 100.	200 cc.

Cuire à l'autoclave 30 minutes à 120° ; séparer le liquide par expression à travers un linge. Filtrer sur ouate hydrophile.

A 50 centimètres cubes de ce liquide, ajouter :

Eau salée à 6 p. 1.000.	150 cc.
Gélose.	5 gr.

Faire fondre à l'autoclave à 100°, répartir en tubes et stériliser à 120°.

A chaque tube contenant ce milieu liquide à 50°, ajouter parties égales de sang défibriné d'homme ou de lapin recueilli aseptiquement. Agiter légèrement sans faire de bulles et coaguler en position inclinée.

Le développement du microbe ne devient visible qu'après 24 à 48 heures. Colonies très petites, blanches, proéminentes, à bords taillés à pic. Elles sont fragiles et ne se conservent guère plus d'un mois vivantes.

Le b. de la coqueluche est hémolysant. Il contient une endotoxine nécrosante.

*
* *

C. — **Bacille de R. Pfeiffer** (non spécifique de l'influenza, mais presque constant dans cette maladie).

Ce bacille, très petit, abonde dans les crachats des malades. On le colore facilement par la fuchsine diluée, le bleu de méthylène alcalin ou la thionine phéniquée. Il ne prend pas le Gram. Il est recommandable de traiter d'abord la préparation, avant de la colorer, par une solution à 1 p. 100 d'acide acétique. On voit alors mieux les amas de microbes parmi les cellules.

On le cultive sur gélose arrosée ou mélangée de sang

humain, ou additionnée d'extrait d'hématies (Legroux) (voir milieux vitaminés). pH limites : 6,2-7,6 ; pH optimum : 7,0.

Les colonies se développent en gouttes transparentes, homogènes, confluentes, seulement entre 27 et 42° (optimum 37°) en 18 à 24 heures. Il faut les réensemencer tous les 4 ou 5 jours, car elles sont très fragiles.

Le microbe est tué par 15 à 20 minutes de chauffage à 50°.

*
* *

D. — **Chancre mou** (*Bacille de Ducrey*).

Petit diplobacille en chaînettes, très grêle, ne prenant pas le Gram. On le colore très élégamment par la méthode de Unna-Pappenheim. Les coupes de tissu, fixées par l'alcool ou le formol à 4 p. 100, sont traitées pendant 10 minutes par la solution suivante :

Vert de méthyle.	0 gr. 15
Pyronine.	0 gr. 25
Alcool absolu.	2 cc. 5
Glycérine.	20 cc.
Eau phéniquée à 0,5 p. 100.	200 cc.

On lave à l'eau, puis à l'alcool et au xylol. On monte ensuite dans l'huile de cèdre ou le baume. Les diplobacilles sont colorés en rouge pourpre foncé, les tissus en vert bleuâtre.

Culture assez difficile à obtenir. Pour l'isolement, partir d'un chancre d'inoculation protégé par un pansement aseptique, ouvert au second jour et bien nettoyé. Prélever pour la culture le tissu du fond de l'ulcération.

Le meilleur milieu est la gélose peptonée, à 3,5 p. 100 d'agar, additionnée du tiers de son poids de sang défibriné de lapin. Répartir en tubes d'assez gros volume qu'on incline et préparer le jour même. (Ce milieu peut être légèrement modifié en stérilisant dans une fiole d'Erlenmeyer 90 grammes de gélose nutritive à 3 p. 100 d'agar et en y ajoutant 20 grammes seulement de sang défibriné de lapin.)

Ensemencer une douzaine de tubes, les mettre à l'étuve à 35°. La culture se développe en moins de 24 heures et l'on y

observe, dans l'eau de condensation, les longues chaînes typiques du streptobacille. Des tubes identiques, conservés à la glacière, serviront pour la purification des premières cultures et ensuite pour les passages.

Le milieu de conservation le plus favorable est la gélose molle (gélose nutritive à 2,5 p. 1.000 d'agar) additionnée de 1/5 de son volume de sang défibriné. Le développement s'y fait rapidement, la vitalité atteint un mois et les repiquages y sont très faciles.

*
* *

E. — **Bacille de Weeks** (*Conjonctivite contagieuse, ophtalmie aiguë d'Egypte*).

Coloration. — Gram, puis safranine ou fuchsine phéniquée diluée (10 minutes). Ne prend pas le Gram. Immobile.

Culture. — Gélose-ascite ou gélose-sang humain.

Diplobacille de Morax-Axenfeld (*Blépharo-conjonctivite infectieuse*).

Coloration. — Thionine phéniquée (pas de centre clair, coloration homogène). Ne prend pas le Gram. Immobile.

Culture. — Gélose-sérum humain un peu suralcalinisé.

Diplobacille liquéfiant de Petit (*Kérato-conjonctivite*). Ne prend pas le Gram. Pousse sur la gélose peptone ordinaire et liquéfie la gélatine.

*
* *

F. — **Bacille de Nedden** (*Kératite ulcéreuse*).

Ne prend pas le Gram. Immobile. Pousse en bouillon et sur gélose peptone (glycérinée ou non) ; coagule le lait ; ne forme pas d'indol.

*
* *

G. — **Pneumobacille de Friedlander.**

Plusieurs variétés de microbes saprophytes constituent le groupe des *bacilles muqueux encapsulés*, dont le prototype

est le pneumobacille de Friedlander. Ils ont tous des caractères communs : ils sont immobiles, non ciliés, non sporulés, sont facilement colorables par les couleurs d'aniline, ne prennent pas le Gram, se cultivent aisément sur les milieux usuels, sont aérobies et anaérobies facultatifs, ne liquéfient pas la gélatine, forment des colonies en amas muqueux gras porcelainés, ne produisent pas d'indol et sont incidemment pathogènes pour l'homme et pour les petits animaux, particulièrement pour la souris blanche et pour le cobaye en injection intrapéritonéale.

Le pneumobacille type de Friedlander fermente le glucose et le lactose en dégageant des gaz. Il ne coagule pas le lait.

H. — **Rhinosclérome** (*bacille de Frisch*).

L'aire géographique est étendue à toute l'Europe orientale. Ce bacille se trouve dans le mucus nasal des malades et dans la lymphe du sclérome nasal. Il est encapsulé et ne prend pas le Gram. On le colore bien par l'action prolongée du violet de méthyle ou de la thionine ; les capsules par la safranine. Il ressemble beaucoup au Pneumobacille de Friedlander. Sa culture s'obtient aisément et présente sur les milieux gélosés et sur pomme de terre les mêmes aspects gras, boursouflés de bulles gazeuses. Il pousse abondamment sur gélose glycérinée, ne coagule pas le lait et ne fermente ni le glucose ni le lactose. Il ne produit pas d'indol.

I. — **Microbe étudié par J. Bordet dans la diphtérie des poules.**

Microbe très petit, en bâtonnet grêle ou en point, formant des masses zoogléiques dans les cultures. Facilement colorable par le Giemsa après fixation par l'alcool absolu, sans chauffer (5 gouttes de solution de Giemsa, pour 2 centimètres cubes d'eau distillée). On laisse le réactif colorant agir pendant 30 à 45 minutes sur la lame, la face imprégnée de culture ou de frottis étant tournée en dessous pour éviter

les dépôts, puis on lave à l'eau, on dessèche et on examine dans une goutte d'huile à immersion.

Se cultive sur gélose arrosée ou mélangée de sang de lapin, ou sur le milieu qu'utilise Bordet pour la culture du microbe de la coqueluche, ou encore dans du bouillon peptonisé additionné d'un demi-volume de sérum frais de lapin. Les cultures restent longtemps virulentes.

On isole le microbe soit en ensemençant les larmes de l'œil infecté, soit en broyant une fausse membrane avec un peu de solution salée physiologique, en trempant un fil dans cette émulsion et en passant ce fil dans la membrane nictitante de l'œil d'une poule saine. Le lendemain, on retire le fil et, au bout de quelques jours, lorsque la nictitante est épaissie, on la résèque, on la lave à l'eau stérile, on la broie et on ensemence le produit de cette émulsion à la surface de plusieurs tubes. Après 2 jours, les colonies visibles sont des impuretés ; mais si l'on promène le fil de platine sur les parties du tube où il semble que rien n'ait poussé, on ramène le virus qu'on peut repiquer sur d'autres tubes où il se développera à l'état pur. La culture est à peine visible à l'œil nu.

J. — **Gourme du cheval** (*Streptococcus equi*).

Longues chaînettes de streptocoques divisées en tétrades. Coloration par le Gram, surtout dans les frottis. Les lavages un peu prolongés à l'alcool décolorant les cultures, la thionine phéniquée convient mieux pour celles-ci.

Se développe bien en bouillon, en gélatine, sur gélose et sur sérum de cheval coagulé, mais les milieux doivent être alcalinisés au delà du point de neutralisation à la phénolphtaléine (1 à 3 centimètres cubes de lessive normale de soude pour 100 centimètres cubes de milieu). Il perd rapidement sa virulence sur les milieux artificiels. Il est tué par 30 minutes de chauffage à 58°.

CHAPITRE XXXIII

BACILLE TYPHIQUE. — B. PARATYPHIQUES ET BACTERIUM COLI.

A. — **Bacille typhique.**

Caractères biologiques. — Petit bâtonnet mobile, portant, à sa périphérie, de 10 à 12 cils environ, quelquefois plus, non sporulé. Se développe bien sur les milieux usuels à 37°, très lentement à 20°, plus du tout au-dessous de 9°. pH limites : 6,2-7,6. pH optimum : 6,8-7,2.

Se colore avec facilité. Ne prend pas le Gram. Trouble le bouillon. Ne liquéfie pas la gélatine (caractères communs à tous les microbes de ce groupe). Sur gélose et gélatine, colonies de forme irrégulière, aplaties, grisâtres, humides, translucides, irisées lorsqu'on les regarde à la lumière incidente, et à centre proéminent. Sur pomme de terre, culture à peine visible, apparaît seulement après quelques jours comme une traînée luisante.

Ne produit pas d'indol dans les milieux peptonés.

Ne coagule pas le lait ; ne fermente ni le lactose ni le glucose.

Ne décolore pas le rouge neutre, la safranine, le vert malachite, l'indigo, le bleu de méthylène ; décolore lentement l'orcéine.

Recherche du bacille typhique dans le sang des malades. bile pure (procédé Conradi). — Le meilleur procédé consiste à projeter, avec une seringue, 2 ou 3 centimètres cubes de sang (prélevé par ponction dans une veine superficielle) dans un tube à essai contenant 5 centimètres cubes de bile de bœuf pure, filtrée sur ouate hydrophile et stérilisée. On porte à l'étuve à 37° pendant 48 à 72 heures, et on réensemence sur les milieux différentiels.

Procédés de Kayser-Zeidler, de L. Tribondeau et J. Dubreuil. — Au lieu de bile pure, on emploie la bile

additionnée de 10 p. 100 de peptone et de 4 p. 100 de glycérine. On stérilise 2 heures à 100° (sans pression). *L. Tribondeau et J. Dubreuil* préconisent la bile additionnée de 1 gr. de peptone et de 1 gr. de glucose par 100 centimètres cubes. (Les paratyphiques y dégagent de petites bulles de gaz.)

Procédé J. Courmont. — On ensemence 2 à 5 centimètres cubes, de sang dans un grand ballon contenant 200 à 500 centimètres cubes de bouillon. On cultive 24 heures à 37° et on réensemence sur milieux différentiels.

Recherche du bacille dans l'eau et dans les déjections suspectes. — Suivant les circonstances, on peut choisir entre deux méthodes : l'une consiste à ensemencer 100 centimètres cubes ou 1 litre de l'eau suspecte dans un milieu d'enrichissement avant de faire les cultures sur milieux différentiels ; l'autre, en général préférable, consiste à filtrer 10 à 100 litres d'eau suspecte à travers une bougie Chamberland stérile. On recueille avec un pinceau ou un petit tampon d'ouate stérile le dépôt qui s'est accumulé à la surface de la bougie ; on le délaye dans un tube contenant 10 centimètres cubes d'eau stérile et on ensemence cette émulsion, d'abord dans le milieu d'enrichissement ci-après, puis, avec un autre pinceau ou tampon d'ouate stérile, à la surface de boîtes de Pétri contenant les milieux solides d'isolement.

Milieu d'enrichissement de Ficker et Hoffmann. — Dans un grand ballon contenant 900 centimètres cubes de l'eau suspecte, on ajoute successivement les solutions suivantes qui ont été stérilisées séparément par chauffage discontinu à 100°.

Solution de nutrose à 10 p 100.	80 cc.
Sol de caféine à 2 gr. 5 p. 100	20 cc.
Sol. de crystall-violet à 0 gr. 1 p. 100. .	10 cc.

On porte à l'étuve à 37° pendant 12 heures et on ensemence ensuite sur les milieux d'isolement.

Pour isoler le b. typhique des déjections, on se sert avec grand avantage de ce milieu qu'on prépare alors en ajoutant, à 90 centimètres cubes d'eau stérilisée, 8 centimètres cubes de solution de nutrose, 2 centimètres cubes de solution de caféine et 1 centimètre cube de solution de crystall-

violet. Ce mélange stérile est ensemencé avec 1 gramme ou 0 gr. 50 de déjections suspectes et laissé à l'étuve pendant 12 heures. On reporte ensuite, par dilutions convenables, sur milieux d'isolement.

La recherche du bacille typhique dans les déjections est plus commodément effectuée en utilisant la technique de Biérast modifiée par Hall :

On mélange 1 ou 2 grammes de déjections, dans un mortier de porcelaine stérile, avec 8 centimètres cubes de bouillon nutritif par petites portions, à la pipette. Lorsque le mélange est bien homogène, on y ajoute 2 centimètres cubes d'éther de pétrole (P. S. 650) ; on le verse dans un flacon stérile bouché à l'émeri ou avec un très bon bouchon de liège et on le soumet à une agitation continue pendant une demi-heure (autant que possible au moyen d'un appareil donnant 150 secousses à la minute). On laisse ensuite la masse en repos pendant 2 heures, puis on fait les ensemencements sur les milieux électifs choisis.

L'agitation avec l'éther de pétrole a pour effet d'éliminer presque complètement le Bacterium coli et elle permet de retrouver le *bacille typhique* et aussi le *paratyphique* B, alors même que ceux-ci n'existent que dans la proportion de 1 p. 1 000 par rapport au B. coli. C'est un procédé particulièrement recommandable pour la recherche des bacilles dans les déjections des « porteurs de germes ». Le *paratyphique* A est sensible à l'éther de pétrole comme le coli. *Le bacille dysentérique Shiga se comporte comme le typhique.*

Milieux d'isolement. — Ces milieux solides servent à isoler les bacilles qui sont cultivés dans le milieu d'enrichissement ci-dessus, ou qui se trouvent dans une urine suspecte, ou dans le produit de délayage du dépôt des bougies filtrantes.

Ils peuvent servir aussi à isoler directement les bacilles des matières fécales ou de l'urine. On prépare alors une émulsion de déjections (environ 1 gramme pour 200 centimètres cubes d'eau) et avec un pinceau ou un tampon d'ouate stérile, on ensemence cette dilution, ou directement quelques gouttes d'urine, à la surface des milieux coulés en boîtes de Pétri et desséchés par 24 heures d'exposition à l'étuve à 37°, le couvercle étant dirigé en bas.

Les milieux de choix sont ceux de *Drigalski-Conradi*, d'*Endo*, de *Chantemesse*, de *Conradi* et surtout ceux de *Löffler-Schuster* au vert malachite, de *Ludwig Bitter* au vert malachite-bleu de Chine et de *Schmitz* (gélose-sérum au rouge Congo).

1° *Milieu de Drigalski-Conradi* :

On prépare séparément :

1. Une macération de viande (1.050 grammes de viande de bœuf ou de cheval, finement hachée, pour 2 litres d'eau). Laisser 24 heures à la glacière ; exprimer, faire bouillir 1 heure ; compléter au volume de 2 litres. Ajouter :

Peptone de Witte.	20 gr.
Sel marin.	10 gr.
Nutrose (ou Tropon).	20 gr,
Gélose (finement hachée).	60 gr

Porter à l'autoclave à 120°, 30 minutes. Filtrer à chaud sur ouate hydrophile ou sur sable.

(On peut remplacer la macération de viande par une solution à 10 p. 1.000 d'extrait Liebig).

2. Solution :

Teinture de tournesol.	300 cc.
Lactose.	30 gr.

Faire bouillir 15 minutes dans l'autoclave non boulonné ; décanter après repos, aseptiquement.

3. Solution de soude à 10 p. 100, stérilisée.

4. Solution :

Crystall-violet chimiquement pur de Höchst (O.).	0 gr. 10
Eau distillée chaude.	100 cc.

Dans le bouillon gélosé n° 1, chaud et liquide, verser la solution n° 2 (tournesol-lactose) ; agiter fortement, puis ajouter une quantité suffisante de solution n° 3 (soude) jusqu'à ce que la masse bleuisse légèrement. Ajouter encore 6 centimètres cubes de la solution n° 3 (soude), puis 20 centimètres cubes de la solution n° 4 (crystall-violet).

Répartir aseptiquement par 200 centimètres cubes en ballons stériles qu'on peut conserver pour les besoins ultérieurs. Au moment de s'en servir, on liquéfie au bain-marie et on verse en boîtes de Pétri de 18 à 20 centimètres de diamètre. Sur ce milieu, le bacille d'Eberth et les para-

typhiques donnent des colonies rondes, ressemblant à des gouttes de rosée, incolores ou bleuâtres, quelquefois dentelées légèrement, toujours transparentes ; le B. coli donne des colonies rouges, opalescentes.

2° *Milieu d'Endo.*

Bouillon peptoné gélosé neutre préparé à la manière ordinaire auquel, fondu à 100°, on ajoute, par litre, 10 centimètres cubes de lessive normale de soude (à 40 p. 1.000), puis 10 grammes de lactose dissous dans 100 centimètres cubes d'eau.

Répartir en gros tubes par fractions de 100 centimètres cubes ou en petits ballons et conserver après stérilisation à l'autoclave.

Au moment de l'usage, on fait fondre le contenu d'un ou plusieurs de ces tubes ou ballons et, à chacun d'eux, on ajoute :

Sol. alcool. de fuchsine à 1 p. 10 (filtrée).	0 cc. 5
Sol de sulfite de soude à 1 p. 10 (fraîchement préparée).	2 cc. 5

Agiter pour mélanger (sans faire de bulles) et couler en plaques.

Le bacille typique donne des colonies incolores, de 3 millimètres de diamètre environ, en 24 heures. Le B. coli donne des colonies rouges opaques. Après 48 heures, les colonies typhiques deviennent roses et deux fois plus grandes que celles de B. coli.

3° *Milieu de Chantemesse.*

Eau.	100 cc.
Peptone.	3 gr.
Lactose.	2 gr.
Gélose.	2 gr.

Au moment de l'emploi, liquéfier ce milieu et ajouter pour 10 centimètres cubes, dans chaque tube, avant de couler en plaques :

Acide phénique solution à 3 p. 100. . . .	IV gouttes.
Teinture de tournesol.	1 cc.

Ce milieu convient surtout à l'isolement des Bact. coli. Il est beaucoup moins favorable que les précédents (et surtout que les suivants) à l'isolement du b. typhique qui est plus sensible que le B. coli à l'acide phénique.

4° *Milieu de Conradi.*

a) Eau distillée.	900 cc.
Extrait Liebig.	20 gr.
Gélose.	30 gr.

Stériliser, filtrer sur ouate. Ajouter :

Sol. stérilisée de peptone Witte à 10 p. 100.	100 cc.

b) Acidifier le milieu à 3 p. 100. Pour cela, prélever un échantillon et chercher combien il faut ajouter de lessive normale de soude ou de solution normale d'acide phosphorique, pour obtenir une acidité telle que 100 centimètres cubes soient neutralisés à la phtaléine du phénol par 3 centimètres cubes de solution normale de soude.

c) A 1.500 centimètres cubes de ce milieu acidifié, ajouter :

Vert brillant crist. (Grübler), sol. aq. à 1 p. 1.000.	10 cc.
Acide picrique sol. aq. à 1 p. 1.000. . .	10 cc.

Stériliser et répartir en tubes ou en boîtes. Le B. coli ne pousse que difficilement. Les colonies typhiques sont vert clair, transparentes, aplaties et elles apparaissent grenues à la loupe. Les paratyphiques sont vert jaunâtre, plus proéminentes.

5° *Milieu de Löffler-Schuster au vert malachite-safranine-bleu de méthylène.*

On prépare 1 litre de bouillon gélosé ordinaire (ou Liebig) avec 3 p. 100 de gélose. On y ajoute, après neutralisation aussi exacte que possible (au tournesol) par une solution saturée de carbonate de soude, et après dissolution de la gélose :

Sol. décinormale de soude.	5 cc.
Sol. à 10 p. 100 de nutrose.	100 cc.

On porte pendant 20 minutes à 100°.

On décante par repos, on sépare le précipité et on répartit par doses de 100 centimètres cubes dans une série de vases d'Erlenmeyer ou de ballons à fond plat qu'on stérilise et conserve d'avance.

A chaque dose de 100 centimètres cubes de cette gélose fondue à 50° et décantée, on ajoute :

Bile de bœuf filtrée et stérilisée.	3 cc.
Sol. aq. à 0,2 p. 100 de safranine pure de Grübler.	1 cc.
Sol. aq à 1 p. 100 de bleu de méthylène de Höchst.	3 cc.

ou :

0 cc. 1 d'une sol. aq. à 0,5 p. 100 stérilisée d'Azobleu.	
Sol. aq. sat stéril. de vert malachite cristallisé (chimiquement pur, chlorzinkdoppelsalz, de Höchst)..	2 à 4 cc.

ou :

1 cc. 7 d'une sol. aq. à 0,2 p. 100 stérilisée de vert malachite ordinaire.

Verser après mélange en larges boîtes de Pétri.

Sur ce milieu, de couleur violet bleuâtre, ensemencé en surface (au pinceau) avec une goutte de dilution de déjections, le bacille d'Eberth donne des colonies *bleues*, irrégulières, molles et minces, à reflets métalliques très caractéristiques.

Le paratyphique B donne des colonies identiques.

Le paratyphique A, des colonies rondes, transparentes, bleuâtres, sans reflets métalliques.

Les microbes du groupe Gärtner et le B. coli donnent des colonies roses ou rouges.

6° *Milieu au bleu de Chine* (*Chinablau*), *de Ludwig Bitter*.

A 100 centimètres cubes de gélose-peptone neutralisée au tournesol (bouillon gélosé à 2 ou 3 p. 100 de gélose) et préalablement fondue au bain-marie, on ajoute 2 grammes de lactose. On laisse fondre quelques minutes, en agitant, à 100°, puis on introduit dans le ballon 9 gouttes de solution aqueuse saturée de bleu de Chine. On peut y ajouter aussi, mais les avis sont partagés sur les avantages de cette addition, 2 cc. 5 de solution aqueuse à 0,1 p. 100 de vert malachite ordinaire (ou 1 centimètre cube de solution à 0,1 p. 100 de vert malachite cristallisé pur). On stérilise 10 minutes à 100° et on verse dans des boîtes de Pétri (3 boîtes pour un essai sur matières fécales ; 2 boîtes pour l'urine). On laisse sécher à l'étuve pendant quelques heures pour qu'il n'y ait pas d'eau de condensation à la surface. Pour cela, on retourne les plaques sens dessus dessous. On ensemence une première plaque en étalant sur la moitié de

celle-ci, gros comme une lentille de déjections avec une spatule de platine, et on essuie la spatule sur l'autre moitié de la plaque. On frotte avec la même spatule, sans reprendre de semence, la deuxième, puis la troisième plaque, et on porte à l'étuve à 37° pendant 24 heures.

Les bacilles qui forment des acides donnent des colonies bleues ; ceux qui ne forment pas d'acides ou qui sont alcaligènes donnent des colonies incolores ou jaunâtres. Ces dernières seules sont soumises à l'épreuve de l'agglutination.

7° *Milieu de Schmitz* (gélose-sérum-rouge Congo).

La préparation de ce milieu est très économique. Elle dispense d'employer de la viande. On recueille à l'abattoir, sans précaution particulière, du sang de bœuf ou de mouton. On le laisse coaguler. On décante le sérum qu'on utilisera à part, comme il sera dit plus loin. Le caillot est mélangé au double de son poids d'eau, grossièrement délayé et soumis à la cuisson pendant 5 à 10 minutes, puis filtré sur un linge d'abord et ensuite sur ouate hydrophile. On ajoute à ce liquide 20 grammes par litre de peptone, 20 grammes de nutrose (ou de Tropon) et 60 grammes de gélose. On fait fondre celle-ci et, lorsqu'elle est bien dissoute, on ajoute, à la masse, un volume égal du sérum primitivement séparé des caillots. On répartit par 100 centimètres cubes, dans des flacons, en filtrant encore sur un entonnoir à ouate hydrophile et on stérilise à 100° seulement pendant une heure

On dissout, à chaud, aux environs de 95°, dans chacune de ces doses de 100 centimètres cubes de gélose-sérum, 1 gr. 50 de lactose et 0 gr. 30 de rouge congo. La dissolution est très rapide. On peut aussi ajouter de la caféine à ce milieu (mais si l'addition de caféine a pour effet d'empêcher le développement du Bact. coli, elle gêne beaucoup celui du b. typhique). On prépare alors une solution de 1 gramme de caféine dans 10 centimètres cubes d'eau (celle-ci se dissout complètement dans ce volume d'eau bouillante, tandis qu'elle exigerait 80 centimètres cubes d'eau froide). On introduit 6 centimètres cubes de cette solution de caféine dans chaque dose de gélose-sérum. On coule aussitôt après dans une grande boîte de Pétri, sans stériliser de nouveau pour ne pas modifier le lactose.

On ensemence ces plaques, lorsqu'elles ont fait prise,

avec une anse de platine de déjection délayée dans 200 centimètres cubes d'eau salée physiologique.

Sur ce milieu le *Bact. coli* ne pousse que difficilement, en donnant des colonies de couleur bleu noirâtre, tandis que déjà après 24 heures les colonies rouges de bacille typhique sont très apparentes.

Chandelier en a simplifié très heureusement sa préparation. Il emploie du bouillon gélosé ordinaire (à 3 p. 100 de gélose), lactosé à 1,5 p. 100, exactement neutralisé au tournesol, réparti en ballons de 100 centimètres cubes et stérilisé à 115°.

A 100 centimètres cubes de ce milieu, préalablement fondu au bain-marie à 50°, on ajoute :

Sol. de soude à 0 gr. 5 p. 100, stérilisée.	10 cc.
Puis sol. aq. stérilisée de rouge congo à 3 p. 100.	10 cc.

Puis on coule en grandes boîtes de Pétri stériles dont le couvercle est garni d'une rondelle de papier filtre, sur lequel s'effectuera la condensation de la vapeur d'eau dégagée pendant la solidification de la gélose. On ensemence ensuite et on porte à l'étuve.

Les colonies typhiques sont apparentes au bout de 24 heures, sous l'aspect de petites masses aplaties, sèches, écailleuses, cupuliformes et de couleur *rouge foncé*, les colonies de B. coli se détachent en *bleu foncé* sur le fond rouge. Les colonies de bacilles dysentériques de Shiga et de Flexner donnent des colonies de même aspect et de même couleur que le bacille typhique.

Ce milieu est, avec celui de Löffler-Schuster, le plus recommandable pour l'isolement du bacille typhique. C'est incontestablement celui qui, en l'état actuel de nos connaissances, fournit les meilleurs résultats.

*
* *

B. — Milieux différentiels permettant d'identifier le bacille typhique, les paratyphiques A et B et le Bacterium coli.

1° *Lait tournesolé.* — Répartir du lait très frais et non

écrémé dans des tubes, par 8 centimètres cubes environ. Stériliser 15 minutes à 110°, ajouter au moment de l'emploi la teinture aqueuse de tournesol à 2 p. 100 (6-8 gouttes dans chaque tube). Ensemencer avec une goutte de culture de bouillon.

2° *Petit-lait tournesolé* (*Petruschky*). — Porter à 40° du lait écrémé, ajouter de la présure en pastilles et laisser coaguler, à la température du laboratoire, pendant 2 heures. Jeter le caillot coupé en morceaux sur un linge fin. Alcaliniser le filtrat avec de la soude jusqu'au rouge franc de la phtaléine. Ajouter 2 grammes de $CaCl^2$ cristallisé par litre. Porter 15 minutes à 110°. Filtrer sur papier jusqu'à ce que le liquide passe clair. Vérifier que la réaction est violet foncé au tournesol. Ajouter une solution aqueuse de tournesol (2 p. 100) jusqu'à ce que la teinte soit assez foncée. Filtrer sur bougie. Répartir. Eprouver (deux jours à l'étuve, puis huit jours au laboratoire). Capuchonner. Ensemencer avec une goutte de culture en bouillon.

3° *Gélose au sous-acétate de plomb*. — Préparer des tubes de gélose ordinaire avec 5 centimètres cubes de liquide. Au milieu chaud, ajouter 0 cc. 1 de sous-acétate de plomb en solution au dixième, mélanger, laisser refroidir.

Ensemencer largement en partant d'une culture sur gélose inclinée. Le fil de platine chargé doit être introduit entre la paroi du tube et le milieu au plomb. Faire ainsi plusieurs traits nets.

4° *Gélose au rouge neutre*. — Préparer la gélose ordinaire, mais avec seulement 0,4 p. 100 de gélose, de façon que le milieu soit à peine solide (gelée tremblante). Ajouter à la fin 2 grammes de glucose par litre et la quantité de rouge neutre juste suffisante pour teinter le milieu en rose très clair, soit environ 0 cc. 75 de la solution au centième pour 100 centimètres cubes. Répartir en tubes droits.

5° *Bouillon glucosé carbonaté* :

Bouillon normal.	100 cc.
Glucose.	2 gr.
Carbonate de chaux.	1 pincée.

Répartir en tubes et stériliser 30 minutes à 115°.

6° *Bouillon lactosé carbonaté* :

Même préparation en remplaçant le glucose par du lactose.

7° *Artichaut.* — On coupe des fonds d'artichauts en tranches de 2 à 3 centimètres de longueur sur 1 centimètre d'épaisseur. On les stérilise à 120° pendant 20 minutes dans les tubes à essai. Ensemencer en une strie médiane.

*
* *

C. — Paratyphique A.

Caractères biologiques. — Le para A a les mêmes caractères morphologiques et culturaux que le bacille d'Eberth. Il s'en distingue par les caractères suivants : Il a comme pH limites 4,5-7,8 et comme pH optimum 6,4-7. Il décolore lentement la gélose au rouge neutre et provoque sa fluorescence. Il rougit franchement le petit-lait tournesolé. Il ne noircit pas la gélose au plomb.

*
* *

D. — Paratyphique B.

Caractères biologiques. — Le para B a des caractères différentiels plus nettement accusés. Son pH est analogue à celui du Para A. Mais en bouillon, il dégage souvent une odeur fécaloïde. En gélose inclinée, la culture est plus abondante sous la forme d'un enduit épais, opaque, souvent visqueux. Sur pomme de terre, la culture est abondante, épaisse, brunissant rapidement. Comme pour l'Eberth et la para A, le lait n'est pas coagulé, mais il s'éclaircit tardivement Le petit-lait tournesolé rougit très vite, puis bleuit (caméléonage). La gélose au rouge neutre est décolorée et on observe sa fluorescence. L'artichaut est verdi en 24 heures. Contrairement au para A, la gélose au sous-acétate de plomb est noircie comme par l'Eberth.

*
* *

E. — Caractères différentiels du bacille typhique, des paratyphiques A et B et du Bacterium coli sur chacun des milieux précédents.

	Bacille typhique	Paratyphiques A	Paratyphiques B	Bacterium coli
1° *Lait*	Pas de changement	Pas de changement	Pas de coagulation. Eclaircit tardivement	Coagulation parfois tardive
2° *Petit-lait tournesolé*	Rougit légèrement	Rougit franchement	Rougit très vite, puis bleuit (caméléonage)	Rougit très fortement
3° *Milieux d'Endo ou de Drigalski*	Colonies incolores	Colonies incolores	Colonies incolores	Colonies rouges
4° *Milieux au plomb*	Noircit	Ne noircit pas	Noircit	Ne noircit pas (quelques exceptions)
5° *Gélose au rouge neutre*	Pas de modification	Décoloration lente. Fluorescence	Décoloration Fluorescence	Décoloration Fluorescence intense
6° *Bouillon glucosé carbonaté*	Pas de fermentation	Fermentation	Fermentation	Fermentation abondante
7° *Bouillon lactosé carbonaté*	Pas de fermentation	Pas de fermentation	Pas de fermentation	Fermentation abondante
8° *Artichaut*	Pas de verdissement	Verdissement nul ou lent	Verdissement en 24 heures	Verdissement rapide
9° *Mobilité*	Mobile	Mobile	Mobile dans les cultures âgées de moins de 12 heures, puis immobile	Généralement immobile ou peu mobile
10° *Formation d'indol*	Négative	Négative	Négative	Positive

*
* *

F. — Méthodes de recherche de la réaction de l'indol.

Cette recherche doit se faire sur des cultures en eau peptonée, âgées de 48 heures. (Peptone 50 grammes, sel marin 5 grammes, eau 1 litre.) Employer les peptones Poulenc, Chapoteau ou Collas. Examiner les cultures après 2 et 8 jours.

a) *Réaction de Salkowsky.* — A un tube contenant environ 15 centimètres cubes de culture, ajouter :

XXX gouttes de solution de nitrite de potassium à 1 p. 1.000, puis en agitant légèrement et en laissant couler le long du verre,

XX gouttes d'acide sulfurique chimiquement pur.

Coloration rose, due au nitroso-indol, s'il s'est formé de l'indol.

b) *Réaction de Legal-Weyl.* — A un tube de culture, ajouter 4 à 5 gouttes de solution de nitro-prussiate de soude à 5 p. 100, puis après agitation, quelques gouttes de lessive de soude à 40 p. 100. Le liquide devient rougeâtre. En ajoutant environ 10 gouttes d'acide acétique cristallisable la couleur vire au bleu-vert s'il y a de l'indol.

c) *Recherche de l'indol par le papier oxalique.* — Des bandes de papier à filtrer, larges de 5 millimètres environ, stérilisées par flambage au four Pasteur dans des boîtes de Pétri, sont largement imprégnées de solution aqueuse saturée d'acide oxalique et séchées à l'étuve.

On introduit une de ces bandes à l'intérieur d'un tube de culture (contenant l'eau peptonée ensemencée) de telle sorte que la bande ne touche pas le milieu de culture, mais demeure suspendue au-dessus de celui-ci et maintenue en place par le bouchon d'ouate.

S'il y a de l'indol, on voit le papier se colorer nettement en rose au bout de 1 à 3 jours.

d) *Réaction de Fleig et Sicre.* — A un tube de culture, ajouter 10 centimètres cubes de solution alcoolique de fur-

furol à 1 p. 50, puis quelques gouttes d'acide chlorhydrique pur. *Coloration jaune* s'il s'est formé de l'indol.

e) *Réaction d'Ehrlich.*

1° Paradiméthylaminobenzaldéhyde	5 gr.
Alcool à 96°	380 gr.
Acide chlorhydrique pur.	80 gr.

2° Solution saturée de persulfate de potassium dans l'eau distillée. A 10 centimètres cubes de culture en bouillon ou en eau peptonée, on ajoute 5 centimètres cubes de la première, puis 5 centimètres cubes de la seconde solution. On mélange par agitation. La présence d'indol se manifeste par une coloration rouge. L'addition de 1 à 2 centimètres cubes d'alcool amylique pur rend la coloration encore plus nette.

1) *Procédé de A. Berthelot.* — 1° Opérer sur 10 à 15 centimètres cubes de culture contenue dans un tube à essai ; prendre la réaction de celle-ci au papier de tournesol et alcaliniser franchement au moyen de quelques gouttes de lessive de soude si besoin est.

2° Ajouter un volume égal d'éther purifié, agiter doucement pendant quelques minutes, puis laisser déposer jusqu'à ce que la couche éthérée soit bien limpide, au moins dans la moitié supérieure. Si l'émulsion est trop stable, on l'additionne de quelques gouttes d'alcool.

3° Avec un tube à effilure courte, prélever 3 à 4 centimètres cubes de la solution éthérée en évitant d'entraîner des gouttelettes du milieu de culture.

4° Ajouter à l'éther, ainsi recueilli dans un tube à essai, 1/4 de son volume d'une solution de p. diméthylaminobenzaldéhyde à 4 pour 100 dans l'alcool à 96°. Mélanger intimement en agitant.

5° A l'aide d'un tube effilé, faire arriver au fond du tube contenant le mélange précédent, 2 à 3 centimètres cubes d'acide chlorhydrique. Laisser reposer 5 minutes, puis examiner sur un fond blanc. La présence d'indol est décelée par l'apparition d'un anneau rouge, légèrement violacé, dans la zone de séparation des deux liqueurs ; lorsque la quantité d'indol est assez forte, la coloration s'étend à toute la couche

inférieure. Une teinte plus violacée tendant vers le bleu indique la présence de scatol.

Faire toujours une réaction dans deux tubes témoins, l'un pour s'assurer que la peptone employée seule ne contient pas d'indol, l'autre avec une culture de Bacterium coli, pour s'assurer que la peptone employée donne bien de l'indol en présence de ce bacille.

Les cultures en eau peptonée de *bacille typhique* et de *paratyphique A ne donnent jamais d'indol.*

Les cultures de *paratyphique B* en donnent quelquefois (notamment avec la peptone de Witte), mais faiblement.

Les cultures de *Bacterium coli donnent toujours de l'indol, sauf dans les milieux sucrés fermentescibles par ce microbe.*

*
* *

G. — Diagnostic par la réaction d'agglutination.

I. — Identification des cultures par un sérum agglutinant type (sérums anti-Eberth, antipara A et antipara B.

Elle peut s'effectuer soit par la méthode d'examen en gouttes pendantes, soit par les mélanges *in vitro*.

a) *Agglutination en gouttes pendantes*. — Avec une culture sur gélose du bacille suspect, âgée de 24 heures, délayée dans 5 centimètres cubes environ d'eau salée physiologique, on prépare une émulsion aussi homogène que possible. Au moyen d'une anse de platine on en dépose une goutte au milieu d'une lamelle bien propre. Dans cette goutte, avec la même anse de platine (qu'on a stérilisée à la flamme dans l'intervalle), on dépose un volume sensiblement égal d'une dilution à 1 p. 50 du sérum agglutinant type. La dilution dont il s'agit est préparée, au moment de l'usage, en mélangeant dans un tube à essai une goutte de sérum à 2 cc. 5 ou 50 gouttes d'eau salée physiologique.

Le mélange doit toujours être soigneusement agité sur la lamelle même avec le fil de platine.

On renverse la lamelle sur une lame creuse, on attend 20 minutes et on examine au microscope avec un objectif à

sec (n° 6 ou 8, oc. 3 de Stiassnie) en diaphragmant beaucoup.

Une préparation témoin doit être faite sans sérum. On voit immédiatement si les bacilles sont réunis en grumeaux dans la goutte pendante qui a reçu le sérum. Si l'agglutination est nette, c'est qu'il s'agit d'un bacille typhique authentique.

b) *Agglutination en tubes : mesure de l'agglutinabilité.* — Dans une série de petits tubes à essai, on verse un même volume (1 centimètre cube) de dilutions à taux progressivement décroissants d'un même sérum agglutinant-type dont le pouvoir agglutinant maximum a été déjà antérieurement précisé (1/5.000^{e} par exemple). Les dilutions successives sont faites à 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000, etc. (Voir tableau ci-après.)

Dans chacun des tubes, on introduit une goutte (ou une anse de platine) d'une émulsion homogène de la culture à déterminer, émulsion faite en délayant toute la culture de 24 heures dans 1 centimètre cube seulement d'eau salée physiologique.

On porte les tubes à l'étuve à 37° pendant 3 heures (délai optimum) et on note ensuite, en les examinant à la loupe, ceux des tubes dans lesquels les bacilles se montrent agglomérés ou suspendus en grumeaux. Le taux de l'agglutinabilité de la culture est indiqué par le titre de la dilution de sérum qui a produit une agglutination nette.

Une expérience témoin doit toujours être effectuée avec une culture typhique authentique ayant servi à titrer le pouvoir agglutinant du sérum, pour s'assurer que celui-ci n'a pas varié.

II. — Diagnostic de l'infection typhique humaine ou expérimentale par la séro-agglutination de F. Widal. — Les prises de sang se font soit à la seringue, dans une veine, soit par aspiration capillaire à la pipette après piqûre du lobule de l'oreille ou de la pulpe du pouce (préalablement comprimé à sa base et fléchi au maximum) au moyen d'une aiguille stérile. Il faut toujours prendre soin de laver la peau à l'alcool avant de faire la piqûre.

On sépare le sérum après coagulation du caillot ou, si l'on est pressé, on défibrine le sang par agitation avec un fil de platine, et on centrifuge.

Tubes	Mélanges	Taux de l'agglutination
1er	0 cc. 5 de culture (X gouttes) + 1 goutte sérum dilué au 1/10e	1 p. 100
2e.	1 cc. » (XX ») + 1 » »	1 p. 200
3e.	1 cc. 5 » (XXX ») + 1 » »	1 p. 300
4e.	2 cc. » (XL ») + 1 » »	1 p. 400
5e.	2 cc. 5 » (L ») + 1 » »	1 p. 500
6e.	3 cc. » (LX ») + 1 » »	1 p. 600
7e.	3 cc. 5 » (LXX ») + 1 » »	1 p. 700
8e.	4 cc. » (LXXX ») + 1 » »	1 p. 800
9e.	4 cc. 5 » (LIX ») + 1 » »	1 p. 900
10e.	5 cc. » (C ») + 1 » »	1 p. 1.000

On utilisera une culture de 24 heures de bacille d'Eberth authentique, *en eau peptonée, de préférence*. A défaut de culture en eau peptonée, on émulsionnera dans 10 centimètres cubes d'eau salée physiologique une culture sur gélose de 24 heures.

Deux tubes à essai suffisent pour chaque épreuve.

Dans le premier tube, on verse, avec une pipette graduée stérile, 2 cc. 5 (ou 50 gouttes) et dans le second tube 5 centimètres cubes (ou 100 gouttes) de culture.

Immédiatement après, on laisse tomber, dans chacun de ces deux tubes, avec une pipette effilée, stérile, 1 goutte de sérum à éprouver. La dilution du sérum dans le premier tube est donc de 1 p. 50 et dans le second de 1 p. 100.

On agite légèrement les deux tubes et on les laisse au repos, autant que possible à la température de 37°, pendant au moins 30 minutes et au plus 3 heures.

On pratique alors l'examen macroscopique à la loupe. Celui-ci suffit souvent à mettre en évidence l'apparition de grumeaux plus ou moins compacts.

Lorsque l'examen est fait après 30 minutes, les grumeaux ne sont pas visibles macroscopiquement, mais si la réaction est positive, ils apparaissent très nets au microscope.

Pour les observer, il suffit de prélever, avec une anse de platine, une goutte de chacune des dilutions au 1/50 et au 1/100. On porte cette goutte entre la lame et la lamelle et on examine sans coloration avec un objectif à sec n° 6 ou 8, Oc. 3 (de Stiassnie), en diaphragmant beaucoup. Par comparaison, on fait une préparation témoin avec une goutte de la culture sans sérum.

Si l'agglutination est nette dans le second tube, où le sérum est dilué au 1/100, on dit que le taux de l'agglutination est de 1 p. 100.

Si l'on veut préciser le taux de l'agglutination au delà de 1 p. 100, on fait une dilution du sérum au 1/10 (0 cc. 1 de sérum pour 0 cc. 9 d'eau salée physiologique). On opère alors de la manière suivante :

Dans une série de tubes à essai, on verse successivement 1/2 centimètre cube, 1 centimètre cube, 1 cc. 1/2, 2 centimètres cubes, 5 centimètres cubes et 10 centimètres cubes de culture de bacille d'Eberth de 24 heures en eau peptonée. Puis on laisse tomber, dans chacun de ces tubes, une

goutte de la dilution du sérum au 1/10e. On agite et on porte à l'étuve pendant 3 heures. Au bout de ce temps, on fait l'examen macroscopique à la loupe, puis l'examen microscopique d'une anse de platine du contenu de chaque tube. Si l'agglutination est positive dans les 1er, 2e et 3e tubes par exemple, et négative dans le 4e, on en conclut que la limite du pouvoir agglutinant du sérum étudié est de 1 p. 300. L'expérience se lit ainsi :

Le taux de 1 p. 100 suffit pour établir un diagnostic clinique. Si la réaction est positive seulement à 1 p. 50 et négative à 1 p. 100, le diagnostic reste douteux et l'épreuve sera renouvelée deux ou trois jours plus tard. En pareil cas, il est également indiqué d'effectuer parallèlement, et dans les mêmes conditions, l'examen du sérum suspect vis-à-vis du *paratyphique B*, qui est le plus commun. Mais on devra se rappeler que parfois les sérums normaux agglutinent le *paratyphique B* à 1 p. 80 et même à 1 p. 100. Le diagnostic de *paratyphoïde B* ne sera donc établi que par une séro-agglutination positive au taux de 1 p. 200 au moins, alors que le b. d'Eberth ne se montrera agglutiné par le même sérum qu'à moins de 1 p. 100.

*
* *

H. — Salmonelloses.

On groupe, sous ce nom, toute une série d'infections produites par des bacilles qu'il est impossible de différencier du *paratyphique B* au point de vue bactériologique.

Ce nom est dû au bacille trouvé par *Salmon* dans le *Hog-choléra* (pneumo-entérite du porc). Actuellement ce microbe est considéré comme agent d'infection secondaire au cours de cette maladie qui est due à un *virus filtrant*.

Le groupe des *Salmonella* comprend un certain nombre de microbes à caractères généraux communs, pathogènes pour l'homme et pour divers animaux, principalement pour les rongeurs, les bovidés et les porcs. Ce sont tous des bacilles courts, ciliés et mobiles, ne prenant pas le Gram, non sporulés, poussant sur la pomme de terre, peptonisant ordinairement le lait sans le coaguler, ne formant pas d'indol, ne fermentant pas le lactose mais fermentant le glu-

cose et certains autres sucres, décolorant les milieux additionnés de rouge neutre.

On y range les bacilles des empoisonnements alimentaires (*Aertrycke* et *Gärtner*), le bacille de la *psittacose*, le *Bacillus typhi murium* (*de Löffler*) et le *virus Danysz*, ainsi que le *bacille de la septicémie des veaux* (*de Thomassen*). *Lomry et Gillet* ont été amenés à diviser les para B en trois groupes par leurs propriétés fermentatives et leurs caractères d'agglutination : 1° les *para* B^1, race homogène type normal décrit par *Schottmüller* : c'est le para B ordinaire ; 2° les *para* B^2, ensemble de souches moins homogènes, dont le type est le *bacille d'Aertrycke* ; il se rattache aux para B^1 et se sépare nettement des para B^3 ; 3° les *para* B^3, race tout aussi homogène et aussi uniforme que celle des *para* B^1, qui correspond au type décrit par *Gärtner* et qui comprend le *bacille de Norseele*, les *B. typhi murium* et le *virus Danysz*.

Bacillus typhi murium et virus de Danysz. — *Milieu de culture pour les virus destinés à la destruction des souris et des rats.* (Bacillus typhi murium de Löffler, Danysz, etc., variété de paratyphique :)

Extrait de viande Liebig.	10 gr.
Peptone.	15 gr.
Sel marin.	5 gr.
Carbonate de baryum	5 gr.
Eau.	1 litre

Faire bouillir et ajouter q. s. de lessive de soude pour bleuir le papier de tournesol rouge. Inutile de filtrer. Stériliser à l'autoclave à 120°, 30 minutes. Refroidir. Ensemencer avec une culture virulente et laisser 48 heures à l'étuve à 37°.

Le virus doit être utilisé dans le plus bref délai, Avec un litre dilué dans 3 litres d'eau salée à 5 p. 1.000 et mélangé avec 8 kilogrammes de grain écrasé ou concassé, on prépare 12 kilogrammes d'appât.

Préparation en grandes quantités du virus pour la destruction des rats, des campagnols et des souris (*Danysz*). — Mélanger dans des récipients de grande capacité 10 grammes d'extrait de viande, 15 grammes de peptone, 5 grammes de sel de cuisine et 5 grammes de carbonate de chaux ou de baryum par litre, chauffer jusqu'à ébullition en

remuant de temps en temps, puis ajouter de la lessive de soude en quantité suffisante pour que le liquide donne une teinte légèrement violacée au papier de tournesol rouge. Répartir ce bouillon chaud à 70° environ, dans des bouteilles, sans cesser d'agiter la masse du liquide pour que le carbonate de chaux reste à l'état de suspension homogène et soit également distribué. Boucher les bouteilles avec des tampons de coton et les recouvrir avec un capuchon de papier. Porter à l'autoclave et chauffer pendant 30 minutes à 115°-120°. Cette stérilisation à l'appareil de Vaillard exige au total environ 2 h. 1/2 pour 105 à 106 bouteilles.

Vingt-quatre heures avant l'expédition, on ensemence, avec 1 centimètre cube de culture de B. typhi murium, les bouteilles maintenues à 36°. Au moment de l'envoi, on substitue, aux bouchons de coton, des bouchons de liège stérilisés à 120°, à l'autoclave, dans un bain de paraffine.

Pour l'emploi, ce virus peut être dilué dans 3 fois son volume d'eau salée à 5 p. 1.000. Le liquide dilué est ensuite versé sur l'appât, de l'avoine concassée de préférence, dans la proportion de 4 litres de liquide pour 8 kilogrammes de grains. Remuer pour que l'avoine soit régulièrement imprégnée de virus. Au bout de 2 ou 3 heures, on peut la répandre dans les locaux et les champs infestés de petits rongeurs. On compte en moyenne une bouteille de virus, soit 12 kilogrammes d'appât par hectare.

Pour l'infestation des campagnols un milieu composé de :

Eau	1 litre.
Son.	250 gr.
Peptone de riz.	5 gr.
Soude normale.	5 cc.
Sel ordinaire.	4 gr.

donne une culture très riche. La virulence du bacille (à égalité de nombre de germes) est égale à celle du bacille cultivé en bouillon.

*
* *

I. — Caractères particuliers au Bacterium coli.

Il en existe un grand nombre de variétés, les unes mobiles, les autres immobiles. Les variétés immobiles n'ont

pas de cils ; les mobiles en ont de 4 à 8, disséminés sur toute la surface du corps microbien.

Peuvent se développer entre 10 et 45°. Température optimum 37° (pH. limites = 4,47-8, pH optimum = 6,0-7,0.

Ne liquéfient pas la gélatine et ne prennent pas le Gram.

Sur gélatine et sur gélose, colonies plates, grisâtres, translucides, irisées à la lumière incidente (orient de la perle un peu sèche) à contours irréguliers. Mais certaines variétés sont molles, épaisses, opaques et non irisées.

Poussent rapidement sur pomme de terre en couche molle, jaunâtre, qui brunit en vieillissant et dégage des vapeurs ammoniacales.

Coagulent le lait en masse compacte en 48 heures à 3 jours, pour certaines variétés plus tardivement.

Décomposent les hydrates de carbone suivants :

Sucres en C^6 : glucose, mannose, fructose, galactose, sorbose.
Sucres en C^5 : arabinose, xylose, rhamnose.
Sucres en C^{12} : saccharose, lactose, maltose, mélibiose, tréhalose.
Sucre en C^{18} : raffinose
Alcools hexatomiques : Mannite, Dulcite, Sorbite.
Alcool pentatomique : Erythrite.
Alcool triatomique : glycérine.

Cette décomposition des sucres et de certains alcools est une dégradation moléculaire avec dégagement d'hydrogène, d'acide carbonique, de méthane et production de quantités variables d'acides lactique, acétique, formique, butyrique, proprionique, succinique, ainsi que de traces d'alcool et d'acétone. Les caractéristiques essentielles des Bacterium coli sont :

1° La propriété de décomposer le lactose en CO^2 et H avec formation d'acides lactique, acétique et formique ;

2° De former rapidement de l'indol dans les milieux peptonés ;

3° De réduire, surtout en culture anaérobie, certaines couleurs telles que l'indigo, le bleu de méthylène, le bleu de toluidine, la safranine, l'orcéine, le rouge neutre, le vert malachite. Ces matières sont transformées en leucobases

incolores et reprennent leur coloration normale si on les agite avec de l'air.

Le Bacterium coli, dans les cultures en bouillon, produit une hémolysine thermostabile qui dissout fortement les hématies de chien, faiblement celles de bœuf, de cheval et de lapin et qui n'attaque pas celles de cobaye, de mouton, de porc, d'homme.

Ce microbe est agglutinable par les sérums homologues, plus fortement, souvent à 1 p. 5.000, par les sérums préparés avec la souche même de B. coli que l'on cultive ; plus faiblement, de 1 p. 100 à 1 p. 1.000, à des taux très variables par les sérums préparés avec des Bact. coli de diverses origines.

La réaction de fixation du complément donne, elle aussi, des résultats très divers, suivant qu'on emploie, comme antigène, le Bacterium coli qui a servi à préparer le sérum sensibilisateur ou un bact. coli étranger.

On isole le Bacterium coli du sang ou des divers excreta des malades avec les mêmes méthodes qui servent à isoler le bacille typhique (*bile pure*, *milieux de Drigalski-Conradi* ou de *Löffler*).

Caractères différentiels de culture des principales espèces de microbes du groupe Bacterium coli et des groupes voisins (d'après *Castellani* et *Chalmers*).

A : production d'acide	A + K : production d'acide d'abord, puis d'alcali	+ : positif.
G : production de gaz		0 : négatif.
C : coagulation	L : réaction légère	± : douteux ou variable.
P : pellicule de surface	T : trouble.	

Dénomination	Mobilité	Maltose (C^{12})	Glucose (C^6)	Lactose (C^{12})	Mannite	Dextrine	Dulcite	Saccharose (C^{12})	Lait tournesolé	Gélatine liquéfiée	Bouillon neutre	Indol
B. coli communis (Escherich). . . .	+	AG	AG	AG	AG	AG	AG	0	AC	0	T	+
B. coli immobilis (Durham).	0	AG	AG	AG	AG		AG	0	AC		T	±
B. paracoli (Day).	+	AG	AG	0	AG	AG	0	0	A + K	0	TP	0
B. paracoli (Mair).	+		A	A	AG		0	0	AC	0	T	+
B. pseudo-coli (Castellani).	+	AG	AG	AG	AG		AG	AG	AC	0	T	+
B. cloacoe (Jourdan).	+	AG	AG	AG	AG	AG	0	AG	AC	+	T	±
B. acidi lactici (Hueppe).	0	AG	AG	AG	AG	AG	0	0	AC	0	T	+
B. lactis aerogenes (Escherich). . .	0	AG	AG	AG	AG	AG	0	AG	AC	0	TP	±
B. entericus (Castellani).	0	AG	AG	AG	AG		AG	0	0	0	T	0
B. para-entericus (Castellani). . . .	+	AG	AG	AG	AG		AG	AG	A	0	T	+
B. ceylonensis a (Castellani. . . .	0	0	A	0	0		0	0	AC	0	TP	0
B. pyogenes foetidus (Passet). .	0	A	A	A	A	A	A	A	AC	0	T	+
B. hog-choléra (Evans).	+		AG	0	AG		AG	0	A + K	0	T	+(tr.)
B. enteritidis a (Gärtner).	+	AG	AG	0	AG	AG	AG	0	A + K	0	T	±
B. icteroides (Sanarelli).	+	AG	AG	0	AG	AG	0	0	A + K	0	TP	+
B. psittacosis (Nocard).	+	AG	AG	0	AG	AG	AG	0	A + K	0	T	0
B typhosus (Eberth).	+	A	A	0	A	A	0	0	A	0	T	0
B. paratyphoid A (Schottmüller). . .	+	AG	AG	0	AG	AG	AG	0	A	0	T	+
B. paratyphoid B (Schottmüller). . .	+	AG	AG	0	AG	AG	AG	0	A + K	0	T	+(tr)
B. infantile diarrhœa (Duval, Baltimore).	0	A	A	0	A	A	0	0	A + K	0	T	+
B. dysenteriæ (Shiga-Kruse). . . .	0	0 ou LA	A	0	0	0	0	0	AL + K	0	T	0
B. dysenteriæ (Flexner).	0	A	A	0	A	0 ou A	0	0	A + K	0	T	+
B. dysenteriæ (Hiss et Russel). . .	0	0	A	0	A	0	0	0	L + K	0	T	+
B. asylum dysenteriæ (Kruse). . .	0	0	A	0	A	A	0	0 ou A	AL + K	0	T	+
B. asylum dysenteriæ (Eyre). . .	0	AL ou 0	A	0	0	AL ou 0	0	0	AL + K	0	T	0
B. para-dysenteriæ (Castellani). . .	0	AL	A	0	0		0	0	A	0	T	+

*
* *

J. — Typhose aviaire.

On comprend, sous le nom de typhose aviaire, deux maladies distinctes des volailles causées par des germes très voisins : l'une est la diarrhée blanche des poussins dont l'agent pathogène est le *Bact. pullorum*, l'autre la typhose proprement dite, due à *Bact. sanguinarium* ou *Bact. gallinarum alcalifaciens.*

A. — *Bacterium pullorum.* — Examen à l'état frais. En bouillon Martin court bâtonnet immobile, en navette avec un espace clair.

a) *Coloration.* Se colore facilement par toutes les couleurs d'aniline. Ne prend pas le Gram.

b) *Cultures.* — Température optimum 30 à 37°, croît de 4 à 45°.

Bouillon. — Croissance rapide. Trouble uniforme en 18-24 heures, ondes moirées par agitation, après quelques jours collerette et dépôt blanchâtre ; le liquide s'éclaircit et brunit.

Gélatine. — Développement abondant sans liquéfaction. En piqûre, petit disque opaque à la surface ; petites colonies arrondies, opaques, le long de la culture.

Gélose. — Culture rapide et abondante. Traînée blanchâtre, crémeuse, à bords irisés ou colonies blanches, arrondies, opaques par transparence.

Pomme de terre. — Tantôt nappe incolore, brillante, tantôt nappe foncée brunâtre.

Ce milieu convient à la différenciation du B. pullorum et du B. sanguinarium avec le microbe du choléra des poules qui ne pousse pas sur la pomme de terre.

Lait. — Non coagulé.

B. gallinarum présente des caractères morphologiques et culturaux identiques à ceux de *B. pullorum.* On ne les distingue que par leur action sur le lait tournesolé (réduction très précoce, avec éclaircissement pour B. pullorum, réduction survenant seulement après 30 jours pour B. sanguina-

rium) et leur action fermentative sur les sucres (mannite, arabinose, lévulose, glucose sont fermentés par les deux microbes, mais seul le B. pullorum produit des gaz).

B. pullorum, B. sanguinarium, bacille d'Eberth et bacille paratyphique A ont des agglutinations réciproques avec les sérums correspondants.

*
* *

K. — **Bacillus fœcalis alcaligenes.**

Bacille mobile ou très mobile. Ne prend pas le Gram et présente les caractères généraux du bacille typhique. S'en distingue par la présence de 1 ou 5 cils polaires et non péritriches et son aérobiose stricte. Ne coagule pas le lait qui se clarifie légèrement et devient opalescent en 8 jours. Enduit épais, brun sur pomme de terre. Alcalinise le lait tournesolé et le petit lait tournesolé. N'est pas agglutiné par les sérums antityphiques.

Peu ou pas pathogène. Existe fréquemment dans l'intestin de l'homme.

*
* *

L. — **Proteus vulgaris.**

Examen à l'état frais. Microbe polymorphe, formes en cocci, bacilles et cocco-bacilles. Cilié. Mobile. Non sporulé.

Coloration. — Toutes les couleurs basiques d'aniline. Ne prend pas le Gram.

Culture. pH limites = 4,4-8,4, pH optimum = 6-7. Anaérobie facultatif. Température optima 20 à 25°. Bouillon uniformément troublé, dépôt floconneux et collerette. Odeur ammoniacale.

Gélatine. — Liquéfiée. Sur plaques, colonies nattées, rayonnantes ; en culot, par piqûre, rayonnement en arête de poisson. Odeur putride.

Gélose. — Nappe muqueuse blanc grisâtre, surface irisée, culture rapidement envahissante.

Lait. — Coagulé en 24 heures.

Produit de l'indol. Attaque glucose, lévulose, galactose, saccharose. Pathogène pour la souris, le cobaye et le lapin (abcès, septicémie, intoxication). Tué par chauffage entre 60 et 80°.

Produit une exotoxine et une endotoxine (*A. Berthelot*).

Le Proteus X 19, de Weil-Felix, a la propriété d'être agglutiné par le sérum des malades atteints de typhus exanthématique. On l'utilise pour le diagnostic de cette maladie.

CHAPITRE XXXIV

DYSENTERIES.

A. — Dysenterie bacillaire.

On en distingue habituellement quatre types :

1° *Type Shiga-Kruse*, de beaucoup le plus fréquemment rencontré dans les épidémies de dysenterie de l'hémisphère septentrional et le plus pathogène. Probablement identique au bacille découvert et sommairement décrit par *Chantemesse* et *Widal*, en 1888.

2° *Type Flexner*. Répandu surtout en Asie orientale, au Japon, dans l'Amérique du Nord et en Europe. A été signalé à Marseille.

3° *Type Strong* (îles Philippines, Japon, Chine, Russie et Amérique du Nord).

4° *Type Hiss-Russel* ou *type Y*, auquel sont attribuables surtout les petites épidémies d'asiles d'aliénés (pseudo-dysenterie des fous, de *Kruse*) également rencontré dans des épidémies de dysenterie dans l'Amérique du Nord, en Europe, en Asie orientale. *Dopter* l'a trouvé dans une épidémie à Paris et avait cru pouvoir l'identifier au type *Strong*, le plus commun après le *Shiga-Kruse*.

Les types Flexner et Hiss ont été isolés aussi des déjections de singes (macaques) spontanément infectés dans les laboratoires.

Tous sont immobiles, non ciliés et facilement colorables par le bleu de méthylène ou la fuchsine de Ziehl diluée au dixième. Ils ne prennent pas le Gram.

Ils se cultivent aisément sur les milieux usuels à 37° et à la température du laboratoire. Ils ne liquéfient pas la gélatine et ne coagulent pas le lait. Le bacille de Shiga-Kruse ne pousse pas dans les milieux biliés. Au contraire, le type Flexner s'y développe très bien.

Pour les différencier, il faut les ensemencer dans les

milieux qui servent à l'identification du bacille typhique ou, plus simplement, d'abord en eau peptonée pour la recherche de l'indol, puis dans des tubes de bouillon, légèrement alcalin, tournesolé et additionné respectivement de *lactose*, *glucose*, *saccharose*, *maltose* et *mannite*, dans la proportion de 2 grammes de chaque sucre pour 100 centimètres cubes de bouillon.

La gélose tournesolée mannitée à 2 p. 100 convient parfaitement pour la différenciation du Shiga avec le bacille typhique. Avec le bacille typhique on obtient sur ce milieu, des colonies rouges, tandis que celles de Shiga restent incolores.

Pour l'isolement rapide du bacille de Shiga des matières fécales lors des épidémies de dysenterie, *Kindborg* a préconisé l'emploi de gélose colorée avec de la fuchsine acide et du vert malachite. On prépare ce milieu de la manière suivante :

On fait d'abord une solution à 3 p. 100 de fuchsine acide (fuchsine acide de Riedel-Berlin) et une autre solution à 1 p. 10.000 de vert malachite. Dans 1 litre de bouillon gélosé, neutre au tournesol, on verse 50 centimètres cubes de la solution de fuchsine et 10 centimètres cubes de celle de vert malachite. On ajoute 40 centimètres cubes d'eau dans laquelle on a fait dissoudre 14 grammes de lactose ; on stérilise à 100° et on coule en plaques.

Sur ces plaques, déjà après 12 heures, les colonies de bacilles de Shiga apparaissent entourées d'une auréole décolorée. La décoloration s'accentue ensuite.

Ce caractère de décoloration de la gélose fuchsinée acide est particulier au bacille de Shiga, au bacille typhique et au paratyphique B ; plus faiblement au vibrion cholérique. Le Bacterium coli ne s'entoure d'aucune zone claire.

Voici les caractères des différents types dans les milieux usuels :

Types.

MILIEU DE CULTURE	Shiga-Kruse	Flexner	Strong	Hiss-Russel ou Type Y
Eau peptonée	Pas d'indol	Indol (lent)	Indol en 24 heures	Indol en 24 heures
Bouillon tournesolé — Lactosé	Bleu	Bleu	Bleu	Bleu
Bouillon tournesolé — Glucosé	Rouge. — Pas de gaz	Rouge. — Pas de gaz	Rouge. — Pas de gaz	Rouge violacé. — Pas de gaz
Bouillon tournesolé — Saccharosé	Bleu	Bleu	Rouge. — Pas de gaz	Bleu
Bouillon tournesolé — Maltosé	Bleu	Rouge. — Pas de gaz	Bleu	Bleu
Bouillon tournesolé — Mannité	Bleu	Rouge. — Pas de gaz	Rouge violacé. — Pas de gaz	Violacé. — Pas de gaz
Lait	Pas de coagulation	Pas de coagulation	Pas de coagulation	Pas de coagulation
Petit-lait tournesolé	Rougit faibl. ; redevient améthyste après 24 heures	Rougit plus que le Shiga	Comme le Flexner	Comme le Flexner
Gélose au sous-acétate de plomb	Pas de strie noire	Pas de strie noire	Pas de strie noire	Pas de strie noire
Milieu au rouge neutre	Pas de modification	Parfois légère fluorescence	Comme le Flexner	Comme le Flexner
Agglutination avec un Shiga-Sérum	+	0	0	0
Agglutination avec un Flexner-Sérum	0	+	0	+
Agglutination avec un Hiss-Sérum	0	+	0	+
Agglutination avec un Strong-Sérum	0	0	+	0
Action pathogène expérimentale	Reproduit la dysenterie expérimentale	Pas d'action pathogène expérimentale	Pas d'action pathogène expérimentale	Pas d'action pathogène expérimentale

On peut encore différencier le type Shiga par l'agglutination au moyen d'un sérum de lapin vacciné contre le Shiga. Ce sérum n'agglutine aucun des trois autres types. Inversement, les sérums spécifiques anti-Flexner et anti-Hiss n'agglutinent jamais le type Shiga, mais, par contre, l'un et l'autre agglutinent à la fois les types Flexner-Hiss. Le sérum anti-Strong n'agglutine que le type Strong.

De même, on peut utiliser la réaction de Bordet-Gengou comme procédé auxiliaire de diagnostic. Les bacilles de type Shiga fixent les sensibilisatrices d'un sérum spécifique anti-Shiga et ne fixent pas celle d'un sérum anti-Flexner et anti-Hiss et, inversement, les bacilles des types Flexner, Strong ou Hiss ne fixent pas les sensibilisatrices d'un sérum anti-Shiga.

Il ne semble donc pas y avoir de différence spécifique entre les types Flexner, Strong et Hiss qui ne se distinguent que par quelques réactions culturales. Le type Shiga au contraire, seul intensivement toxigène, est nettement différencié. La dose mortelle de culture virulente du Shiga est, pour la souris blanche, par voie sous-cutanée, de 0 mgr. 02 environ, pesés à l'état frais et, pour le lapin, par voie intraveineuse de 0 mgr. 5. Les cobayes y sont peu sensibles, même par voie péritonéale : 1 milligramme ne les tue pas toujours.

Toxine dysentérique. — Les cultures tuées par la chaleur provoquent chez les animaux inoculés les mêmes symptômes et les mêmes lésions que les bacilles vivants. On en a conclu que l'action du bacille de Shiga devait être liée à la présence d'une toxine dans le corps microbien et libérée dans l'organisme.

Plusieurs procédés permettent de mettre cette toxine en évidence :

Procédé de l'autolyse aseptique (Conradi). — Emulsionner dans 20 centimètres cubes d'eau physiologique une culture sur gélose en boîte de Roux. Mettre à l'étuve à 37° pendant 48 heures. Filtrer sur bougie Berkefeld : 0 cc. 1 du filtrat, injecté dans les veines d'un lapin de 2 à 3 kilogrammes, le tue en 24 heures.

Procédé de Todd et Rosenthal. — Ensemencer du bacille de Shiga en bouillon assez fortement alcalin ; mettre à l'étuve à 37° pendant trois semaines ; puis filtrer sur bou-

gie Chamberland : 0 cc. 01 du filtrat injecté dans les veines d'un lapin de 2 kilogrammes le tue en 48 heures.

Procédé de Nicolle, Debains et Jouan (technique *Rowland*). Les bacilles vivants pesés et versés dans un mortier stérile sont abandonnés au froid pendant une heure ; ajouter 1 partie 1/2 de sulfate de soude fraîchement calciné, broyer.

Pour obtenir l'extrait, ajouter 20 centimètres cubes d'eau distillée à 1 gramme de poudre, abandonner 24 heures au froid et passer ensuite sur de la terre d'infusoires. Le liquide ainsi obtenu est très toxique pour le lapin.

Agglutination par le sérum des malades. — Les sérums normaux agglutinent le Shiga de 1 p. 20 à 1 p. 40 ; les types Flexner, Strong et Hiss de 1 p. 50 à 1 p. 80.

Le sérum des malades, ainsi que celui des convalescents et des porteurs de germes sains, agglutine à des taux très variables. Celui des sujets infectés par le Shiga agglutine de 1 p. 100 à 1 p. 1000. L'agglutination du Shiga à 1 p. 50 par un sérum de malade suffit à établir la très grande probabilité d'un diagnostic positif. Celui des sujets infectés par l'un des autres types n'agglutine pas le Shiga et agglutine souvent indifféremment les trois types Flexner, Strong et Hiss à des taux variant de 1 p. 100 à 1 p. 1000.

Vaccination et sérothérapie. — *Shiga* a essayé de vacciner l'homme par des injections sous-cutanées de bacilles dysentériques tués par la chaleur, mais il a dû y renoncer à cause des troubles locaux et généraux que ces injections produisaient.

Les essais de vaccination par sérum virus ont été également abandonnés.

On peut préparer un vaccin anti-Shiga avec des cultures sur gélose chauffées 1 heure à 60°, desséchées dans le vide, reprises par quelques gouttes d'eau physiologique et sensibilisées pendant 12 heures par un sérum spécifique anti-Shiga (selon le procédé de Besredka). On centrifuge ensuite et on met le précipité décanté en suspension dans de l'eau physiologique. 5 milligrammes de bacilles pesés à l'état frais représentent une dose de vaccin. L'immunité est acquise déjà après 4 à 5 jours (Dopter).

Le Dr Aimé Gauthier a obtenu des résultats intéressants en vaccinant par la voie buccale les réfugiés grecs d'Asie

Mineure avec des cultures polyvalentes de bacilles dysentériques tués par la chaleur et contenant 3 milliards de corps microbiens par centimètre cube. La dose journalière employée était de 1 centimètre cube pour un adulte, de 1/2 centimètre cube pour un enfant de deux à six ans et de 1/4 de centimètre cube pour un enfant au-dessous de deux ans. Elle était renouvelée pendant trois jours consécutifs ; le vaccin était donné dans un peu d'eau.

Le *sérum antidysentérique* préparé à l'Institut Pasteur est à la fois antitoxique, bactéricide et polyvalent à l'égard des divers types de bacilles. La dose à injecter varie de 20 à 100 centimètres cubes et doit être renouvelée si c'est nécessaire. L'immunité conférée est immédiate, mais ne dure que dix à douze jours.

Diagnostic bactériologique de la dysenterie bacillaire. — S'effectue par la recherche du bacille dysentérique dans les selles, ou à son défaut, par le séro-diagnostic.

Examen microscopique des selles. — A l'état frais on constate l'absence d'amibes dysentériques et la très grande abondance des leucocytes.

Isolement du bacille dysentérique. — Doit être pratiqué le plus rapidement possible après l'émission des selles.

Prélever une glaire sanguinolente, la laver 2 ou 3 fois dans de l'eau physiologique. Ensemencer par stries avec un fil de platine ou, de préférence, par étalement avec l'extrémité d'une pipette coudée sur 3 boîtes de Pétri contenant de la gélose lactosée tournesolée, ou de la gélose d'Endo.

Sur la gélose lactosée tournesolée, on ne retient que les colonies bleues ; sur le milieu d'Endo, que les colonies incolores.

Identification des germes. Si après examen à l'état frais, coloration et repiquage sur milieux usuels, les caractères du bacille répondent à ceux du bacille dysentérique, on détermine le type auquel il appartient par :

1° Les fermentations sucrées (voir tableau donné) ;

2° Par l'agglutination avec les sérums expérimentaux anti-Shiga et anti-Flexner.

Séro-diagnostic. — Effectuer le séro-diagnostic par le procédé microscopique (méthode de Widal pour le séro-diagnostic de la fièvre typhoïde) ou par le procédé macroscopique.

Il est indispensable de déterminer le taux d'agglutination du sérum à l'étude par les dilutions successives, à cause de la fréquence des coagglutinations.

Pour le Shiga, ne tenir compte que des taux d'agglutination supérieurs à 1 p. 50, pour les bacilles de Flexner et de Hiss, que des taux supérieurs à 1 p. 100 ou à 1 p. 150.

Bacilles dysentériques dits « atypiques ».

Ces bacilles ont été nommés « pseudo-dysentériques » ou « paradysentériques » ou encore « métadysentériques »

Certains d'entre eux, plus communément appelés paradysentériques, se rapprochent du *Shiga*, *Flexner*, *Hiss* et *Strong*. Ils en diffèrent soit parce que leurs réactions fermentatives ne sont pas superposables à celles de ces microbes, soit parce qu'ils ne sont pas agglutinés par les sérums expérimentaux.

D'autres se rapprochent davantage du colibacille que des dysentériques à cause de la production de gaz dans les fermentations sucrées. Ils ont été plus spécialement désignés sous le nom de « pseudo-dysentériques ».

Dans le premier groupe, on peut ranger le *bacille de Schmitz* et celui de *d'Hérelle*.

Dans le second, les *bacilles de Morgan*.

Le *bacille de Schmitz* ne fait pas fermenter les lactose, mannite, maltose et saccharose, ce qui le rapproche du Shiga, mais contrairement à lui, il produit de l'indol.

Il n'est pas pathogène pour le lapin. Il n'est pas agglutiné par les sérums anti-Shiga, anti-Flexner, anti-Hiss et anti-Strong.

Le *bacille de d'Hérelle* fait fermenter les maltose et mannite, il est inactif sur le saccharose. Il ne vire pas les milieux au rouge neutre. Il ne donne pas d'indol. Il n'est pas agglutiné par les sérums anti-Shiga et anti-Flexner.

Les *bacilles de Morgan* sont mobiles ou immobiles. Dans le bouillon ils dégagent une forte odeur fécaloïde et produisent de l'indol. Sur gélose ordinaire, leurs colonies sont analogues à celles du colibacille. En milieu lactosé, il se produit une acidification légère avec formation de bulles gazeuses. La fermentation des autres sucres est variable, mais quand elle a lieu, c'est toujours avec formation de bulles de gaz, ce qui ne se constate jamais avec les dysentériques typiques. Quand les milieux sucrés au rouge

neutre fermentent, ils virent au jaune canari avec production d'une fluorescence intense.

Les bacilles de Morgan et celui de d'Hérelle donnent, par injection intraveineuse au lapin, une paralysie du train postérieur. Mais les lésions constatées ne sont pas superposables à celles de la dysenterie expérimentale due au bacille de Shiga.

*
* *

B. — Dysenterie amibienne.

Coloration des Amibes. — Sécher les préparations à l'air libre, sans jamais les passer sur la flamme, puis fixer par exposition, durant 10 à 20 minutes, aux vapeurs dégagées par une solution à 2 0/0 d'acide osmique ou mieux par le fixateur suivant (de *Schaudinn*) chauffé à 50° et qu'on fait agir pendant 10 à 15 minutes :

Sol. aq. sat. à chaud de bichlorure de mercure.	2 vol.
Alcool absolu — — .	1 vol.
Acide acétique.	qq.gtt.

Passer ensuite pendant quelques minutes dans l'alcool iodé, puis dans l'alcool à 70° et colorer par le Giemsa ou par l'hématoxyline au fer ou par la méthode de Laveran au bleu Borrel. (Voir : Coloration du sang, protozoaires, chap. VII.)

Coloration par la méthode de S. L. Brug (de Batavia). — Fixer les frottis de selle par la liqueur de Schaudinn ;

Laver à l'eau pendant quelques secondes.

Passer 2 minutes à l'alcool à 70°, iodé, jusqu'à coloration rouge brun.

Laver à l'eau. Passer pendant 2 minutes dans solution d'hyposulfite de soude à 0,2 %.

Laver à l'eau.

Mordancer pendant 10 minutes avec une solution de sel de Mohr à 3 % (sulfate double d'ammoniaque et de protoxyde de fer) : $Fe(AzH^4)^2(SO^4)^2 + 6H^2O$.

Laver pendant 10 minutes à l'eau courante.

Colorer 10 minutes à l'hématoxyline de Heidenhain.

Laver 10 minutes à l'eau courante.

Colorer 1 minute à l'hématoxyline Delafield diluée à 1 p. 10 dans l'eau distillée.

Laver quelques minutes à l'eau.

Colorer pendant 1 minute avec solution concentrée de fuchsine acide (rubine S).

Passer à l'alcool à 96° quelques secondes, à l'alcool absolu 1 minute, au xylol 1 minute et monter en baume.

La chromatine est colorée en noir foncé, le protoplasme en violet, les hématies en rouge brillant.

Pour les coupes d'intestin ou de foie parasité par les amibes, fixer par le Flemming ou le Bouin-Duboscq (voir chap. IX) ; colorer dix minutes par une solution aqueuse saturée de fuchsine ; puis, sans laver, porter pendant 4 à 5 minutes dans parties égales des deux solutions suivantes :

Solution aqueuse saturée d'acide picrique.
Solution aqueuse saturée d'indigo-carmin.

Les amibes apparaissent colorés en gris-bleu rougeâtre ; les noyaux sont violets.

On peut encore colorer par l'hématoxyline ferrique d'Heidenhain, puis par l'éosine.

Faire agir successivement xylol, alcool, alcool lithiné, eau.

Mordancer pendant 24 heures dans l'alun de fer à 3 p. 1.

Colorer 24 heures dans un bain d'hématoxyline à 1 p. 1.

Différencier dans l'alun de fer à 1 %.

Suivre la différenciation au microscope.

Eosine quelques secondes, alcool, xylol, baume.

Culture. — Les amibes dysentériques (*Entamoeba histolytica*) ne se multiplient pas dans les milieux artificiels Mais on peut cultiver les amibes de la terre ou des eaux (en mélange avec les microbes dont ces organismes se nourrissent) sur la gélose de Musgrave et Clegg :

Eau	1 litre
Extrait Liebig.	0 gr. 30 à 0 gr. 50
Gélose lavée.	20 gr.
NaCl.	0 gr. 5

Alcaliniser légèrement à la soude, couler en boîtes plates de Roux, stériliser et solidifier en couche peu épaisse.

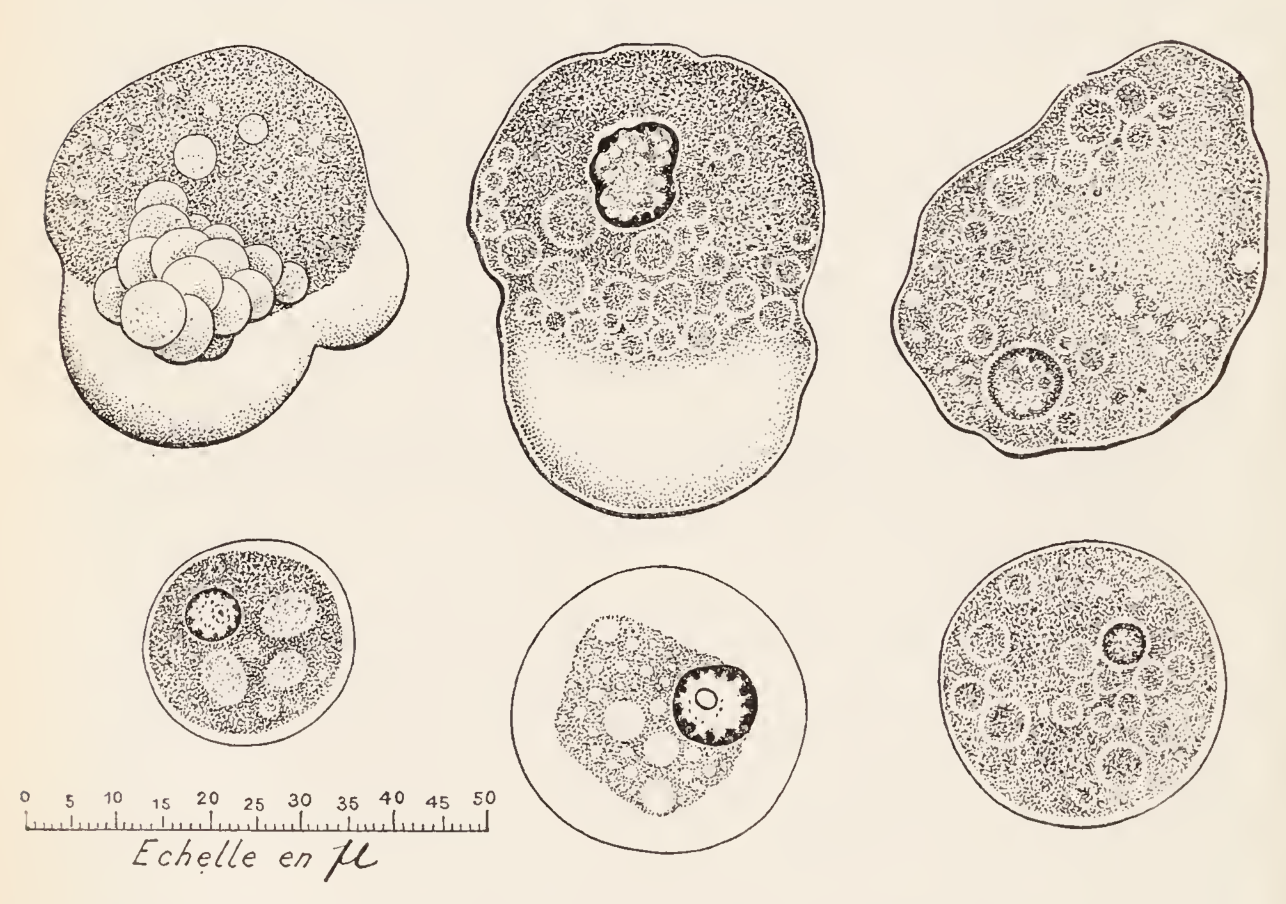
Les amibes de la paille (*Limax*) se cultivent bien sur le milieu de *Von Wasilewski* et *Hirschfeld* :

Eau distillée.	900 cc.
Gélose	10 gr.
Bouillon de bœuf.	100 cc.

On peut aussi obtenir des cultures sur le milieu Novy-Neal-Ch. Nicolle (gélose au sang).

Nota. — On sait aujourd'hui que la dysenterie amibienne est justiciable du traitement de *L. Rogers* par l'*émétine*, alcaloïde de l'ipéca. Cette substance est très toxique pour les amibes, *in vitro* et *in vivo*. Chez l'homme, il est préférable de l'injecter par voie intraveineuse, à la dose de 2 à 3 centigrammes. On emploie aussi avec d'excellents résultats le *Stovarsol* (de Fourneau) qui s'administre par voie buccale, en comprimés de 0 gr. 25, à raison de 4 par jour.

Diagnostic de la dysenterie amibienne. — Se fait par la



Amibes. — 1-2-3. Amibes à l'état mobile. 1. Amœba hystolytica avec inclusions globulaires. 2. La même à la phase Amœba tetragena. 3. Amœba coli. 4 5-6. Amibes à l'état immobile. 4. A. × h contenant encore des globules rouges altérés. 5. Phase A. t. 6. A. coli d'après Ravaut.

constatation dans les selles des amibes dysentériques ou de leurs kystes.

Comme pour la dysenterie bacillaire, les selles doivent être examinées le plus rapidement possible après leur émis-

sion. Les amibes se reconnaissent surtout à leur mobilité qu'elles perdent dès qu'elles se refroidissent. Si l'examen microscopique ne peut être fait au lit du malade, transporter les matières dans un flacon entouré d'eau tiède.

a) *Examen à l'état frais.* — Prélever, avec un fil de platine, une glaire sanguinolente, la déposer entre lame et lamelle et examiner au microscope d'abord à sec, puis à l'immersion en diaphragmant.

La forme mobile d'*Amœba dysenteriæ* dite *A. histolytica* a de 25 à 40 μ. Elle présente une partie centrale granuleuse, l'endoplasme, et une zone périphérique claire, réfringente, l'ectoplasme.

Dans la partie granuleuse, se trouve un noyau plus ou moins visible, tantôt central, tantôt périphérique de 4-5 μ de diamètre.

L'endoplasme contient aussi des globules rouges ou leurs débris qui ont une couleur jaune paille. Ils ont été phagocytés par l'amibe.

L'*A. histolyca* a un déplacement amiboïde caractéristique qui peut être ranimé par la chaleur.

Dans les selles diarrhéiques ou normales, on trouve le type *tetragena* qui correspond au type normal de l'*A. dysenteriæ*. Elle ne mesure que 20-25 μ. Elle a peu d'ectoplasme. Elle est moins mobile. Aussi est-il difficile de la différencier de l'*A. coli* non pathogène, qui est comme elle peu mobile, ne présente pas d'ectoplasme très visible et n'englobe pas de globules rouges.

Dans certains cas, le diagnostic ne peut être posé que par l'examen des kystes qui sont très caractéristiques.

Les kystes apparaissent dans les selles lorsque la crise aiguë est terminée. Ils constituent la forme de résistance de l'amibe. Ils restent intacts dans les selles pendant près de 48 heures.

A l'état frais, les kystes de *A. dysenteriæ* ont un aspect réfringent mesurant 10 à 15 μ. Ils contiennent 1 à 4 noyaux et de petits bâtonnets sidérophiles.

Les kystes d'*A. coli* ont de plus grandes dimensions, 16 à 25 μ. Ils contiennent jusqu'à 8 noyaux et ne renferment pas de bâtonnets sidérophiles.

b) — *Examen après coloration.* — *Vincent* conseille de

déposer, sur les bords de la lamelle, une goutte de solution aqueuse de bleu de méthylène à 1 % : tous les éléments autres que les amibes se colorent immédiatement en bleu et les amibes se détachent par leur teinte claire sur le fond. Il est préférable d'employer le rouge neutre (*Sabrazès*) qui colore en rouge brique les éléments divers et, en rose pâle, les amibes. Le diagnostic sur les amibes fixées et colorées est beaucoup plus difficile à établir : les fixer et les colorer par les méthodes indiquées.

Pour affirmer le diagnostic, il faut pratiquer l'injection d'un fragment de glaire (émulsionné) dans le rectum d'un jeune chat de 1 à 3 semaines (1 cc. environ, avec une sonde fine). Après 7 à 8 jours, l'animal rend des selles glaireuses, très riches en amibes. Il succombe généralement vers le 12e jour avec des ulcérations et une congestion intense de la muqueuse du gros intestin. On peut aussi infecter les jeunes chats par ingestion.

Castellani a signalé à Ceylan une forme de dysenterie due à un protozoaire mobile, de 45 à 55 μ de longueur, colorable en bleu par le Giemsa, contenant des granules chromatiques Il lui a donné le nom d'*Entoplasma*.

CHAPITRE XXXV

CHOLÉRA

A. — Milieux de culture pour la recherche et la détermination des vibrions cholérigènes.

1° Pour la recherche du vibrion cholérigène dans les eaux, il y a lieu de procéder d'abord à l'ensemencement, en aussi grande quantité que possible, de l'eau suspecte dans un milieu d'enrichissement (eau peptonée). Ensuite on procède à l'isolement des germes sur milieux solides (plaques de gélatine au milieu de *Dieudonné*).

La meilleure méthode consiste à filtrer, sur une bougie Chamberland stérile, une dizaine de litres au moins de l'eau suspecte et à recueillir ensuite, au moyen d'un pinceau ou d'un tampon d'ouate stérile, le dépôt laissé par cette eau à la surface de la bougie. Ce dépôt est délayé et versé dans un ballon d'eau peptonée, concentrée (formule *a* ci-après), qu'on dilue avec 90 % d'eau distillée stérile. Si les vibrions s'y trouvent, même en petit nombre, ils ne tardent pas à se développer.

a) *Eau peptonée concentrée* (formule de *Metchnikoff*, recommandée) :

Peptone sèche	10 gr.
Sel marin	5 gr.
Gélatine	20 gr.
Eau distillée q. suffis. pour	100 cc.

Alcaliniser légèrement à la soude et stériliser à l'autoclave 30 minutes à 115°.

On verse 900 centimètres cubes de l'eau suspecte dans un ballon de 2 litres de capacité contenant 100 centimètres cubes de cette eau peptonée de Metchnikoff. On porte à l'étuve à 37° et, si l'eau renferme des vibrions, il se forme, déjà après 6 ou 8 heures, un léger voile à la surface. On en

prend une parcelle avec un fil de platine et on la réensemence dans des tubes d'eau peptonée (même formule, diluée au dixième avec de l'eau stérile), puis sur milieux solides (Dieudonné et plaques de bouillon-gélatine ordinaire) où les colonies de vibrions se développent avec un aspect caractéristique (petites bulles d'air et liquéfaction).

b) *Eau peptonée* (formule allemande) :

Peptone de Witte sèche.	100 gr.
Sel marin.	100 gr.
Nitrate de potasse.	1 gr.
Carbonate de soude cristallisé.	2 gr.
Eau distillée (quantité suffisante pour). .	1.000 cc.

Cette solution-mère doit, pour l'usage, être étendue de 9 fois son volume d'eau dans laquelle il s'agit de rechercher les vibrions.

Pour la culture des vibrions cholérigènes dans les milieux gélatinés ou gélosés, il convient d'alcaliniser fortement ces milieux par addition de 3 % d'une solution à 10 % de lessive de soude. pH limites ; 6,4-7,9, pH optimum 7,0-7,4.

2° Pour la recherche du vibrion cholérigène dans les selles, on peut se servir, soit de la méthode d'*Ottolenghi* (bile de bœuf), soit de l'eau peptonée diluée au dixième comme milieu d'enrichissement.

Lorsqu'il s'agit de selles liquides, on prélève une anse de platine à *la surface de l'échantillon*, après repos de 10 à 15 minutes. Si les matières fécales sont solides (porteurs de germes), on prépare, dans l'eau physiologique (100 centimètres cubes environ), une émulsion d'environ 5 grammes de matières.

L'anse de platine est ensuite plongée dans un tube d'eau peptonée à 2 % (peptone pancréatique, de préférence) qu'on laisse immobile 10 à 15 minutes. Pendant ce temps, on fait un examen direct de la selle au microscope, d'abord à l'état frais, puis après coloration (Gram-fuchsine en sol. aqueuse).

On prélève alors, à la surface du tube d'eau peptonée, une anse de liquide avec laquelle on ensemence, sur toute son étendue, un tube de gélose inclinée (A) qui est capuchonné et mis à l'étuve à 37°, ainsi que le tube d'eau peptonée.

Après 3 heures d'étuve on prélève de nouveau à la surface

du même tube d'eau peptonée, une anse de liquide avec laquelle on ensemence un second tube de gélose (B) qu'on porte à l'étuve à 37°.

Au bout de 10 à 12 heures, les colonies sont apparentes et assez caractéristiques : brillantes, laiteuses, à bords ronds. On émulsionne une de ces colonies dans un peu d'eau physiologique pour en pratiquer l'examen direct à l'état frais, puis après coloration (Gram-fuchsine aqueuse). Avec la même émulsion, on recherche (à 37°) l'agglutination avec le sérum de l'Institut Pasteur, au taux d'au moins 1 pour 500 et jusqu'à 1 pour 10.000. Certains vibrions ne deviennent agglutinables qu'après 3 ou 4 repiquages successifs sur gélose.

La séparation des vibrions développés en voile se fait, comme il a été dit ci-dessus, par réensemencement après 6 heures. Ces réensemencements doivent être effectués en eau peptonée diluée au dixième, en gélatine nutritive coulée en boîtes de Petri, sur milieu de *Dieudonné*, et dans la bile de bœuf.

Le milieu de Dieudonné, employé seul, permet souvent d'isoler d'emblée les vibrions cholérigènes des déjections riziformes.

a) Milieu de Dieudonné (pour les matières fécales). — On mélange parties égales de sang de bœuf ou de porc défibriné et de solution normale de potasse (à 56 grammes d'hydrate de potasse par litre), ou mieux, suivant la méthode de Pilon, on mélange parties égales de sang défibriné et de solution de soude pure, cristallisée, à 12 p. 100. On stérilise à l'autoclave (liquide A).

On prépare d'autre part, selon la technique ordinaire, de la gélose nutritive exactement neutre au tournesol (liquide B). On mélange 7 parties de B pour 3 parties de A et on coule en plaques.

La gélose ainsi obtenue contient environ 0,6 p. 100 de potasse ou de soude [1].

1. On peut remplacer le sang défibriné par une solution d'hémoglobine. On dissout 5 grammes d'hémoglobine dans un mélange de 15 centimètres cubes de lessive normale de soude et de 15 centimètres cubes d'eau distillée. Cette solution est stérilisée à 100° pendant une heure dans l'autoclave non boulonné). On en verse 15 centimètres cubes dans 85 centimètres cubes de gélose nutritive neutre fondue et on répartit en gros tubes à essai. On solidifie par refroidissement, en position inclinée.

Maintenir les plaques découvertes et la face en bas, à l'étuve à 37° pendant quelques jours ou, si l'on est pressé, les chauffer 5 minutes à 65°. Il est mieux de les conserver 48 heures au laboratoire avant l'usage, pour éliminer, par évaporation, une partie de l'ammoniaque qui empêcherait le développement des vibrions.

On ensemence ces plaques en stries avec un pinceau ou un petit tampon d'ouate stérile trempé dans une dilution de 1 gramme environ de déjections dans 10 centimètres cubes d'eau stérile. On essuie successivement le pinceau ou le tampon sur plusieurs plaques, sans le recharger.

On porte à l'étuve à 37° les plaques renversées, le couvercle en bas (pour éviter le dépôt d'eau de condensation à la surface du milieu). Au bout de dix heures, on examine. Les colonies de vibrions sont déjà visibles, tandis que celles de coli et d'autres microbes intestinaux se développent plus tardivement. Il faut donc en pratiquer le réensemencement précoce, en eau peptonée d'une part, sur bouillon gélosé en tube incliné d'autre part, pour identifier ensuite les vibrions par la recherche de la réaction indolnitreuse et par les réactions d'agglutination. Cette identification peut être effectuée sans difficultés 36 à 40 heures après l'ensemencement initial des déjections.

Hoffmann et *Kutscher* ont proposé de dessécher le milieu de *Dieudonné* dans un appareil à vide pour le transformer en une poudre grossière qui peut se conserver indéfiniment en flacon bouché à l'émeri et dont il suffit de faire dissoudre la quantité dont on a besoin dans 9 parties d'eau, au moment de s'en servir. On stérilise la solution à 100° avant de la répartir en plaques.

b) Modifications diverses du milieu de Dieudonné. — 1° Au lieu de se servir de sang frais défibriné, qu'il n'est pas toujours possible de se procurer rapidement, Costa préconise l'emploi de sang « cristallisé » qu'on trouve tout préparé dans le commerce et qu'on peut obtenir soi-même, pour le garder en provision, en desséchant dans des cuvettes, en couche mince, dans un autoclave à vide, à la température de 45°, du sang de bœuf défibriné. Ce sang, finement pulvérisé au mortier, est délayé lentement à froid

avec de l'eau distillée en évitant la formation de grumeaux :

Sang cristallisé	20	gr.
Eau distillée	100	cc.

On verse ensuite dans :

Solution normale de potasse.	100	cc.

Puis on porte à l'autoclave à 100° pendant 30 minutes. On filtre au papier Chardin mouillé, puis on stérilise pendant deux heures à 100° à l'autoclave. Cette solution est ajoutée à la gélose, selon la technique de *Dieudonné*, dans la proportion de 3 volumes de solution pour 7 volumes de gélose. Le mélange est coulé en boîtes de Pétri et peut être utilisé 12 heures après sa solidification.

2° *Baerthlein et Gildemeister* modifient également le milieu de *Dieudonné* en substituant, au sang frais, l'hémoglobine (extrait d'hémoglobine de Pfeiffer). On dissout 3 gr. 50 d'hémoglobine dans 10 centimètres cubes d'eau salée physiologique. On y ajoute 10 centimètres cubes de solution à 5 gr. 50 de soude caustique pure anhydre et 2 centimètres cubes de lessive normale de potasse. On stérilise à 100°. Lorsque le liquide est refroidi aux environs de 50°, on le mélange à 80 centimètres cubes de gélose à 3 p. 100, exactement neutre au tournesol et préalablement chauffée à 80-90°. On agite pour rendre le mélange bien homogène et on coule aussitôt en boîtes de Petri. On dessèche les plaques en position renversée pendant 24 ou 48 heures à l'étuve avant de les employer.

c) MILIEU D'HANS ARONSON. — On prépare d'avance une série de petits ballons ou vases d'Erlenmeyer contenant chacun 100 centimètres cubes de bouillon gélosé neutre, peptoné à 3,5 p. 100, avec de la peptone de Witte, et alcalinisé avec 6 centimètres cubes pour 100 d'une solution à 10 p. 100 de carbonate de soude cristallisé purifié.

A chaque ballon de cette gélose, préalablement fondue au bain-marie ou à l'autoclave, on ajoute :

5 centimètres cubes de solution de sucre (saccharose) à 20 p. 100 ;

5 centimètres cubes de solution de dextrine à 20 p. 100 ;

0 cc. 4 de solution alcoolique saturée de fuchsine basique ou Magenta ;

2 centimètres cubes de solution à 10 p. 100 de sulfite de soude.

Chacune de ces solutions doit avoir été stérilisée à part. On agite ; il se forme un précipité qu'on laisse se déposer mais qu'on ne sépare pas et on coule en boîtes de Pétri en retenant dans le ballon les quelques centimètres cubes de liquide qui contiennent le précipité.

Sur ce milieu très alcalin, qu'on peut utiliser immédiatement, les vibrions cholériques se développent abondamment en 10 à 20 heures, en formant des colonies brillantes, rouges au centre, incolores à la périphérie. Ces colonies grossissent rapidement jusqu'à atteindre 6 millimètres de diamètre. Les colonies de *Bacterium coli* poussent beaucoup plus lentement et gardent une coloration blanche.

L'isolement des vibrions cholériques contenus dans les déjections est très facile avec ce milieu.

d) Milieu d'Ottolenghi (bile de bœuf). Très recommandé. — On mélange, à 100 centimètres cubes de bile de bœuf fraîche, filtrée sur papier, 3 centimètres cubes de la solution suivante :

Carbonate de soude.	10 gr.
Nitrite de potasse.	0 gr. 1
Eau distillée.	100 cc.

On répartit en tubes à essai, à raison de 5 centimètres cubes par tube, et on stérilise à l'autoclave pendant 20 minutes à 115°. On ensemence les tubes avec une anse de platine de déjections suspectes, diluées ou non. On porte à l'étuve à 37° pendant 12 heures et on réensemence directement en eau peptonée gélatinisée ou en bouillon gélatinisé pour isoler les colonies de vibrions.

e) Milieu minéral de Kemal Moukthar.

Phosphate de soude.	0 gr. 8
Asparagine.	0 gr. 4
Lactate d'ammoniaque.	0 gr. 6
Chlorure de sodium.	0 gr. 5
Eau distillée	100 cc.

On fait dissoudre les sels dans l'eau distillée et on stérilise après répartition en tubes. Ce milieu peut être

employé immédiatement. On ensemence les tubes avec une parcelle de matières fécales suspectes et on porte à l'étuve à 37°. Au bout de 5 à 6 heures, le vibrion y donne une culture presque pure tandis que le coli et les autres bactéries intestinales n'ont pas eu le temps de se multiplier. On peut faire ensuite l'isolement sur un milieu préparé comme suit :

Eau distillée.	100 cc.
Phosphate de soude.	2 gr.
Gélatine.	2 gr.
Gélose	2 gr.

On porte à l'autoclave à 120° pendant 15 minutes ; on filtre à chaud et on répartit en larges tubes à essai qu'on laisse solidifier en position inclinée.

Les propriétés biologiques des vibrions ne sont pas modifiées par la culture sur ce milieu minéral.

f) Milieu pour la recherche de la réaction indol-nitreuse (choléra-roth de O. Bujwid).

Peptone de Witte.	10 gr.
Nitrate de potasse.	1 gr.
NaCl	3 gr.
Eau distillée.	1 litre

Après 24 heures de culture, verser dans le tube HCl ou SO^4H^2 pur (1 ou 2 centimètres cubes). Il se produit une coloration rose-rouge. Si la teinte est douteuse, ajouter 1 centimètre cube d'alcool amylique et agiter : l'alcool amylique surnage, coloré en rose par le nitroso-indol.

Cette réaction n'est pas absolument caractéristique, car des vibrions non cholérigènes la présentent, mais elle ne manque presque jamais avec les vibrions cholérigènes authentiques.

g) Milieu pour la recherche des hémolysines. — On incorpore à un tube de bouillon-gélosé (fondu au bain-marie à 50°) 2 ou 3 centimètres cubes de sang de lapin ou de mouton défibriné et on coule en boîte de Pétri. Ou bien, plus simplement, on verse à la surface d'une plaque de gélose, ou d'un tube de gélose inclinée, quelques gouttes de sang de lapin ou de sang humain défibriné.

On ensemence en strie, sur cette gélose au sang, le vibrion qu'on veut étudier (ou tout autre microbe dont on veut

rechercher les propriétés hémolysantes, par exemple le streptocoque).

Si le microbe produit une hémolysine, ses colonies s'entourent d'une auréole claire sur le fond opaque du milieu.

Presque tous les vibrions pseudo-cholériques isolés des eaux produisent, autour de leurs colonies, une zone nette d'hémolyse.

Les vibrions cholérigènes authentiques (sauf le vibrion de Nasik et celui d'El-Tor) ne produisent pas d'hémolysine.

Les cultures, plus ou moins âgées, de quelques rares vibrions non cholérigènes sont cependant assez fortement hémolytiques. Celles du vibrion de Nasik sont le plus actives à 3 semaines. Pour mesurer l'activité de cette hémolysine qui est généralement labile, il ne faut pas filtrer les cultures, mais les centrifuger fortement et longtemps pour éliminer la plupart des éléments microbiens. Le liquide décanté est ensuite mis en contact à doses variables (0 cc. 01 à 0 cc. 5 par exemple) dans une série de tubes à essai, avec un volume constant d'émulsion de sang, par exemple : 0 cc. 5 d'émulsion à 5 p. 100 de sang de mouton défibriné. On complète partout au même volume, 3 centimètres cubes, avec de l'eau salée physiologique ; on porte dans un bain-marie à 37° et on lit les résultats après des temps variables, de 5 en 5 minutes.

Il faut savoir que, dans certains cas, les cultures renferment des substances qui empêchent l'hémolyse, de telle sorte qu'avec de très petites doses de ces cultures, l'hémolyse se produit, tandis qu'avec de fortes doses elle est empêchée.

*
* *

B. — Diagnostic des vibrions cholérigènes par l'agglutination.

Il faut disposer d'un immun-sérum actif au moins à 1 p. 4.000 ; celui de l'Institut Pasteur agglutine jusqu'à 1 p. 10.000.

On prépare une série de dilutions de cet immun-sérum dans l'eau physiologique au taux de 1 p. 500, 1 p. 1.000, etc.

On met, dans une série de petits tubes à essai, 1 centimètre cube de dilution sérique; puis, dans chacun d'eux, on délaye, en ayant soin d'agiter de façon à obtenir un trouble homogène, une anse d'une culture sur gélose, âgée de 18 heures, du vibrion à essayer, provenant d'un isolement sur milieu de Dieudonné ou sur plaques de gélatine. On porte à l'étuve à 37° et on observe les résultats au bout de deux heures.

On considérera, comme ayant donné une réaction positive, toute dilution pour laquelle les vibrions sont réunis en grumeaux déposés au fond du tube et laissant au-dessus d'eux un liquide clair.

Il faut faire, dans les mêmes conditions, deux essais témoins : l'un avec la culture à identifier et du sérum normal de l'espèce animale qui a fourni l'immun-sérum, l'autre avec l'immun-sérum et un vibrion cholérique authentique.

Tout vibrion agglutiné par le sérum à un taux inférieur à 1 p. 500 ne doit pas être considéré comme cholérigène authentique.

L'Institut Pasteur de Paris envoie aux microbiologistes qui en désirent, du sérum de cheval anti-cholérique *agglutinant.* Mais on peut aisément préparer, pour les réactions d'agglutination, un sérum actif en inoculant à un lapin ou à une chèvre, sous la peau d'abord, une petite quantité (une demi-culture sur tube de gélose inclinée) de vibrions cholérigènes authentiques chauffés à 58° pendant 30 minutes, puis quelques jours après, des quantités progressivement croissantes de cultures vivantes (à partir de 1 dixième de culture sur tube de gélose). Le sang recueilli huit jours après la cinquième ou sixième injection fournit généralement un sérum déjà très agglutinant. *Ce sérum ne doit pas être chauffé.* On l'essaye d'abord et on titre son pouvoir agglutinant avec un ou plusieurs vibrions cholérigènes authentiques.

Diagnostic du choléra par le phénomène de Pfeiffer. — On injecte à un premier cobaye (de 300 à 350 grammes environ), dans le péritoine, un mélange de :

Un dixième de culture de 24 heures (sur gélose) du vibrion suspect, émulsionné dans 2 centimètres cubes d'eau salée physiologique, avec 0 cc. 5 ou même 0 cc. 1 de

sérum anticholérique agglutinant à 1 p. 4.000, par exemple.

A un second cobaye de même poids, on injecte, dans le péritoine, la même quantité de la même émulsion du vibrion suspect, mélangée à 0 cc. 5 ou 0 cc. 1 de sérum *normal* de la même espèce animale qui a fourni le sérum anticholérique.

15 à 30 minutes après, on fait une ponction abdominale à la pipette, sur la ligne blanche, l'animal étant tenu par un aide le ventre bombé en bas, de telle sorte que l'exsudat péritonéal s'accumule au voisinage de l'ombilic. Par de légers mouvements de va-et-vient, l'extrémité de la pipette pénètre dans le péritoine et, par capillarité, aspire un peu d'exsudat. On examine celui-ci, d'abord à l'état frais en goutte pendante, puis après coloration à la thionine phéniquée ou mieux suivant la technique ci-après :

On fait agir sur la lamelle, sur laquelle une gouttelette d'exsudat a été étalée et séchée à l'étuve à 37°, d'abord une solution concentrée d'acide picrique, pendant 2 ou 3 minutes, puis une solution à 1 p. 100 d'éosine dans l'alcool à 95°, 2 à 3 minutes ; enfin, pendant 1 à 2 minutes, une solution aqueuse concentrée de bleu de méthylène ou de bleu Borrel.

S'il s'agit d'un vibrion cholérique vrai, l'exsudat provenant de l'animal qui a reçu le sérum anticholérique en mélange avec la culture, montre des vibrions (immobiles en goutte pendante, agglutinés et transformés en granules sphériques), tandis que, dans l'exsudat de l'animal qui a reçu le mélange de culture et de sérum normal, les vibrions sont intacts, mobiles et parfaitement colorables.

On peut réaliser *in vitro* cette réaction en mélangeant, dans de petits tubes à essai stériles, deux gouttes d'émulsion de vibrions avec 1 centimètre cube de dilution au dixième de sérum anticholérique inactivé par chauffage à 56° et 2 gouttes d'alexine fraîche de cobaye. On porte à l'étuve à 37° pendant 2 heures, puis on examine en goutte pendante et sur lame après coloration par la thionine.

Bien entendu, on fait une épreuve de contrôle avec l'émulsion de vibrions, de l'alexine fraîche de cobaye et du sérum normal inactivé par chauffage.

Solution de Rogers pour injections intraveineuses chez les cholériques :

Chlorure de sodium.	1 gr. 5
Chlorure de calcium.	0 gr. 45
Chlorure de potassium.	0 gr. 7
Eau distillée	1 litre

Dose, 1 litre 500 à 2 litres 500, à la température de 37°.

On injecte lentement, à raison de 10 minutes pour 1 litre.

En 1911, à Palerme, Rogers a employé les injections intraveineuses d'un liquide hypertonique composé comme suit :

Chlorure de sodium.	7 gr. 68	Pour 1 seule injection lente
Chlorure de calcium	0 gr. 25	
Chlorure de potassium. . . .	0 gr. 38	
Eau stérile.	567 cc.	

Nota. — En 1911 également, en Tunisie, *Naamé* a obtenu d'excellents résultats de l'injection intraveineuse de 2 à 3 milligrammes d'adrénaline, même en période d'algidité.

CHAPITRE XXXVI

PESTE

La recherche du bacille de la *peste* peut s'effectuer soit dans le liquide de ponction (à la seringue) d'un bubon, soit dans le sang prélevé par ponction veineuse sur le malade ou dans les organes à l'autopsie, soit dans les pustules ou vésico pustules, soit dans les crachats (pneumonie pesteuse).

Le b. pesteux est détruit par 1 heure de chauffage à 60°. Il résiste mal à la dessiccation et à la lumière solaire. Il résiste une dizaine de jours dans les cadavres en putréfaction.

Coloration. — Coloration du sang ou des frottis après fixation par l'alcool-éther. Bleu de méthylène phéniqué ou alcalin, ou bleu boraté (solution à 2 p. 100 de bleu de méthylène médicinal dans solution aqueuse de borax à 5 p. 100). Le bacille de la peste ne prend pas le Gram. Il présente une colorabilité caractéristique des pôles avec le centre clair. Dans les cultures en milieux liquides, formes en chaînettes et formes d'involution avec renflements irréguliers. Le microbe n'est pas mobile.

Culture. — 1° Bouillon simple, pH limites = 5,6-7,5 pH optimum = 6,5-7. Température optimum 30°-35° (aspect caractéristique en flocons), puis voile fragile et stalactites en bouillon gélosé ou gélatiné faiblement alcalin et de préparation récente. Les milieux solides dont la surface est sèche et les milieux légèrement acides ou trop alcalins ne donnent aucun développement de colonies.

2° Gélatine. — Lorsque la recherche porte sur des crachats ou sur des matières purulentes dans lesquelles le bacille de la peste peut se trouver associé à d'autres microbes, l'ensemencement doit être fait en stries sur tubes de gélatine inclinés et ceux-ci seront maintenus hors de l'étuve à la température de 22°. Les colonies de b. pesteux

y deviennent visibles en 2 à 3 jours, tandis que les pneumocoques et les streptocoques ne se développent pas. La gélatine n'est pas liquéfiée.

3° Milieux gélosés. Les colonies sur gélose n'apparaissent qu'après 48 heures de séjour à 30-35°, d'abord en goutte de rosée, puis grisâtres et muqueuses. Les tubes de cultures sur gélose doivent être alors scellés et conservés à la glacière, sinon les bacilles perdent assez rapidement leur virulence. Culture presque nulle sur pomme de terre.

L'ensemencement du sang ou de cultures pures, en vue de l'obtention de grandes quantités de corps microbiens, s'effectuera, de préférence, à la surface du bouillon gélosé, en fioles plates de Roux.

Bouillon gélosé additionné de 2 gr. 5 à 3 gr. 5 p. 100 de chlorure de sodium (ou gélose préparée à l'eau de mer).

Ce milieu convient pour l'observation des formes d'involution caractéristiques du bacille pesteux (formes renflées en boules).

Toxine pesteuse. — Pour la production de la toxine pesteuse, on utilisera les cultures en milieux liquides, de préférence en bouillon, à la surface duquel on aura déposé une petite quantité d'un corps gras (beurre ou huile d'olive) dont les gouttes servent de points d'appui aux stalactites caractéristiques du bacille.

Diagnostic bactériologique. — *A) Chez le malade :*

a) Dans la peste bubonique. Ponctionner le ganglion avec une seringue. Avec la sérosité recueillie :

1° Examen direct. Colorer une lame par le Gram, une autre lame par la thionine.

2° Ensemencer sur gélose et mettre les tubes à l'étuve à 30-35°. Le développement est lent (48 heures). Repiquer les colonies en bouillon pour avoir la culture caractéristique en flocons.

3° Epreuve de la virulence. S'il s'agit de cultures pures (cultures sur bouillon gélosé émulsionnées dans quelques gouttes d'eau salée physiologique), le meilleur procédé consiste à y tremper l'extrémité d'une aiguille d'acier creuse (aiguille à seringue à injection) avec laquelle on pique la peau de la cuisse d'une souris ou d'un rat, ou la paume de

la main ou du pied d'un singe. (L'espèce de singe la plus sensible est le *Semnopithecus entellus* de l'*Inde*, puis ensuite les *macaques*).

S'il s'agit de rechercher la présence de bacilles pesteux virulents dans des crachats, dans du pus ou dans des fragments d'organes prélevés sur un cadavre frais ou déjà putréfié, on prépare une émulsion épaisse du produit dont on dispose et, avec une pipette effilée, on en laisse tomber une goutte sur la muqueuse oculaire d'un rat ou d'un cobaye. Ce mode d'infection entraîne la mort de l'animal en 3 ou 4 jours. On peut encore infecter les rats ou les cobayes par badigeonnage des narines avec un petit tampon d'ouate imprégnée de substance virulente, ou par simple frottement d'une petite étendue de peau fraîchement rasée. L'autopsie des animaux qui succombent à ces différents modes d'infection permet d'isoler le bacille pesteux, à l'état pur, par ensemencement du sang du cœur ou de pulpe de rate.

Le diagnostic peut être facilité par l'injection sous-cutanée, à la souris, de 1 centimètre cube de sérum antipesteux, en même temps que le produit virulent. D'autres souris, conservées comme témoins, sont inoculées avec le produit virulent seul.

S'il s'agit de bacille pesteux, les souris ayant reçu le sérum antipesteux restent vivantes ; celles qui ont reçu seulement les produits virulents meurent avec des lésions renfermant le coccobacille pesteux :

b) Dans la pneumonie pesteuse.

1° Examiner directement les crachats. Faire un Gram pour rechercher s'il existe du pneumocoque.

2° Ensemencer sur gélose et gélatine à 27° pour éviter le développement du pneumocoque.

3° Inoculer une parcelle de crachats au cobaye ou au rat, mais pas à la souris, à cause de sa grande sensibilité au pneumocoque.

B) *Sur le cadavre.* — Lorsqu'on se trouve en présence d'un cadavre suspect de peste, il convient de faire des prélèvements sur des organes plus ou moins accessibles. S'il n'y a pas d'adénopathie, on ponctionnera le cœur et les poumons. La rate est très difficile à atteindre, le foie a l'in-

convénient de se putréfier très vite et de contenir des germes d'origine intestinale qui peuvent prêter à confusion. Un simple examen microscopique ne fournira donc qu'un diagnostic de probabilité. Aussi doit-on faire à la fois des cultures et des inoculations. Si le matériel recueilli est trop souillé pour être injecté sous la peau, la friction sur peau rasée ou l'inoculation au cobaye par scarification restent les procédés de choix.

Diagnostic par la séro-agglutination. — La séro-agglutination peut servir soit à identifier une culture de peste au moyen d'un sérum antipesteux, soit à rechercher la propriété agglutinante dans le sérum de sujets atteints, suspects ou convalescents de peste.

Dans le premier cas, on utilise un sérum antipesteux type (de cheval, par exemple), tel que celui de l'Institut Pasteur, dont le pouvoir agglutinant varie de 1 p. 1.000 à 1 p. 6.000. La culture à identifier (provenant de bouillon gélosé et âgée de 24 à 48 heures) est émulsionnée avec soin dans une quantité d'eau physiologique telle que l'émulsion se présente parfaitement homogène et pas trop épaisse, mais simplement louche. On verse 0 cc. 1 de cette émulsion dans 2 petits tubes à essai contenant chacun 1 centimètre cube d'eau physiologique. Dans le premier, on ajoute 0 cc. 1 de sérum de cheval normal. On agite et on porte à l'étuve à 37° pendant 30 minutes. L'agglutination en petits flocons visibles à la loupe apparaît très nette dans le premier tube, tandis qu'elle est nulle dans le second s'il s'agit d'une culture de peste.

Lorsqu'on se propose de rechercher le pouvoir agglutinant d'un sérum de convalescent ou de malade suspect, on utilise une émulsion homogène de culture de peste authentique, préparée comme il a été dit ci-dessus. On verse 0 cc. 1 dans une série de petits tubes à essai contenant 1 centimètre cube d'eau salée physiologique et, à chacun de ces tubes, on ajoute des proportions variables du sérum à étudier, par exemple 0 cc. 1, 0 cc. 2, 0 cc. 3, 0 cc. 4.... 1 centimètre cube, puis respectivement 0 cc. 9, 0 cc. 8, 0 cc. 7, 0 cc. 6 d'eau physiologique pour compléter partout les volumes à 2 centimètres cubes. On agite, on porte à l'étuve à 37° pendant 30 minutes et on examine à la loupe.

L'apparition de flocons dans l'un des tubes indique le taux auquel le sérum à étudier se montre agglutinant. Le sérum des malades atteints de peste n'agglutine que faiblement, en général à 1 p. 3 ou 1 p. 5. Le sérum normal même à 1 p. 1 n'agglutine pas. L'absence d'agglutination ne permet pas d'écarter le diagnostic de peste. Seule l'inoculation est décisive.

Diagnostic par la réaction de déviation du complément. — Dans toutes les formes où le diagnostic clinique reste douteux, la recherche des anticorps tuberculeux peut donner des renseignements utiles. Ils apparaissent dans le sang au 5e jour de la maladie et y sont encore présents 9 mois après la guérison. La réaction de déviation a donc l'avantage de permettre d'effectuer le diagnostic rétrospectif de la maladie.

Conservation des fragments d'organes destinés aux examens bactériologiques. — Les fragments d'organes sont immergés, aussitôt après leur prélèvement, dans la solution suivante préalablement stérilisée, qui conserve la virulence des bacilles et empêche la putréfaction pendant plusieurs jours.

Solution de *Broquet* :

Glycérine neutre à 30°	20 cc.
Eau distillée	80 cc.
Carbonate de chaux purifié	2 gr.

CHAPITRE XXXVII

DIPHTÉRIE

A. — Coloration. Diagnostic différentiel. Recherche des porteurs de germes.

Le *bacille de Loeffler* peut être mis en évidence dans les fausses membranes par l'examen des frottis et par la culture.

Examen des frottis. — Etaler un fragment de fausse membrane sur une lame. Fixer par l'alcool-éther (parties égales). Colorer par la méthode de Gram. Après lavage à l'eau, colorer par de la fuchsine diluée qui teinte en rouge les microbes ne prenant pas le Gram.

Le bacille diphtérique se présente en amas de bâtonnets à bouts arrondis, légèrement recourbés, renflés en poire ou en massue et colorés en violet foncé.

Culture. — Le milieu de choix, pour l'isolement, est le sérum de bœuf ou le sérum de cheval coagulés.

On doit ensemencer avec la spatule par stries parallèles sur toute la surface du tube. Ensemencer trois tubes sans recharger la spatule pour avoir des colonies bien isolées. Les tubes sont placés à l'étuve à 37°. Le premier examen peut être fait au bout de 18 heures. Ne pas donner de réponse négative avant 48 heures.

Les colonies de b. diphtériques sont rondes, à bord nets, de couleur grisâtre. Si on les regarde par transparence, le centre est plus sombre que la périphérie. Elles sont généralement impures. Si l'on veut rechercher la virulence du bacille étudié ou essayer les méthodes d'identification du bacille, il faut purifier les germes en diluant une parcelle de colonie dans un tube de bouillon et en faisant un isolement sur sérum coagulé.

Caractères des cultures. — pH limites : 6,0-8,3,

pH optimum = 7,3-7,6. En bouillon alcalin, granulations le long des parois et au fond du tube ; le milieu reste clair. Après 24-36 heures, un voile se forme assez souvent à la surface du bouillon.

Sur gélose ordinaire, culture abondante, colonies plus petites que sur sérum coagulé.

Sur gélatine, culture lente.

Sur pomme de terre, culture presque invisible.

Types de bacilles diphtériques. — On peut distinguer, au point de vue de la forme, trois variétés de bacilles diphtériques :

1° Les bacilles longs, de 5 à 7 μ de long ;

2° Les bacilles intermédiaires ou moyens, de 3 à 4 μ de long ;

3° Les bacilles courts, de 1 à 2 μ environ.

La plus grande partie des bacilles provenant des angines diphtériques se classent dans les deux premiers groupes. Parmi eux, les bacilles longs représentent les races les plus toxiques. Les bacilles courts, rares dans les angines, sont fréquents dans les croups.

Faux diphtériques. Bacille d'Hoffmann. Bacille de forme courte, ramassée, prenant le Gram (forme losangique, en fer de lance ou en coin). Colonies plus blanches d'aspect que les colonies de dipthériques, luisantes, crémeuses, à contours moins réguliers. Par transparence, leur centre n'est pas opaque : elles sont plus pâles et plus transparentes que les colonies diphtériques.

Le *Corynebacterium cutis commune*, étudié par Ch. Nicolle, a de très grandes analogies avec le bacille diphtérique vrai : il présente des granulations polaires colorables par la technique de Neisser, il fait fermenter le glucose, mais il fermente aussi le saccharose, ce que ne fait pas le bacille diphtérique vrai.

Coloration simple. — Prend le Gram.

Action de l'alcool absolu. — Le bacille diphtérique, en culture sur sérum coagulé, après 24-36 heures de séjour à l'étuve, traité par la méthode de Gram originale, n'est jamais granuleux. Cet aspect est dû à l'emploi du violet phéniqué, du cristal violet, du bleu de toluidine, ou d'un décolorant trop énergique, ou à l'action trop prolongée de l'alcool absolu.

Si, dans la méthode de Gram on fait agir l'alcool absolu pendant 10-15 minutes, les bacilles des cultures âgées de 24 heures se décolorent et ne montrent plus que quelques grains colorés dans un corps bacillaire à peine visible. Dans les mêmes conditions, les faux bacilles diphtériques de la gorge restent uniformément colorés.

Coloration des corpuscules métachromatiques : Bleu de méthylène potassique de Loeffler :

Sol. saturée de bleu de méthylène dans alcool à 90°.	30 cc.
Solution de potasse à 1/10.000.	100 cc.

Colorer quelques minutes, laver à l'eau et traiter rapidement par la liqueur de Gram. Laver. Les granulations sont noir verdâtre et les bacilles verdâtres.

Coloration au bleu de Roux :

Violet dahlia.	1 gr.
Vert de méthyle.	2 gr.
Alcool.	10 gr.
Eau.	90 gr.

Colorer une minute. Laver, passer dans la vésuvine à 1/250. Les granulations sont bleu foncé, le corps bacillaire est jaune.

Méthode de Neisser (colonies de 24 h. sur sérum).

Bleu de méthylène	1 gr.
Alcool à 90°.	20 cc.

Ajouter après dissolution :

Eau distillée.	950 cc.
Acide acétique glacial.	50 cc.

Faire agir quelques secondes sur les préparations de frottis ou de cultures. Laver, puis colorer 3 à 5 secondes dans solution de vésuvine à 0,2 p. 100 (faite dans l'eau bouillante). Laver à l'eau et examiner.

Pour la coloration des granules polaires, *R. Debré*, *R. Letulle et L. Sergent* préfèrent employer la méthode suivante, dérivée de celle de *Neisser*.

Fixer à la chaleur, colorer avec :

Bleu de méthylène.	1 gr.	Dissoudre le bleu dans l'alcool puis ajouter l'eau et l'acide.
Alcool à 95°.	20 cc.	
Eau distillée	900 cc.	
Acide acétique cristall.	50 cc.	

Chauffer sur la lame jusqu'à émission de vapeurs, changer la couleur et chauffer deux fois, puis laisser 5 minutes en contact. Laver rapidement à l'eau distillée.

Recouvrir le frottis avec solution de vésuvine préparée d'avance comme suit :

Vésuvine.	0 gr. 50	Filtrer bouillant.
Eau distillée bouillante. . .	250 cc.	

Laisser 10 secondes en contact. Laver rapidement à l'eau distillée.

Méthode de Falière :

Bleu de méthylène.	1 gr.
Borax.	0,5
Eau distillée.	100 cc.
Alcool absolu.	VIII gtt.

Triturer dans un mortier le bleu avec l'alcool, ajouter le borax puis, par petites quantités, l'eau jusqu'à dissolution. Faire agir ce colorant pendant quelques secondes, laver à l'eau et colorer le fond avec solution aqueuse de vésuvine à 0,1 p. 100.

Méthode de Ljubinsky (très recommandée) :

On fait agir sur la préparation, préalablement fixée par l'alcool absolu, la solution suivante (pendant 1/2 à 2 minutes) :

Pyoctanine.	0, 25
Acide acétique, sol. aqueuse à 15 p. 100. . .	100 cc.

Laver à l'eau, puis colorer pendant 30 secondes avec une solution de vésuvine à 1 p. 1.000 (aqueuse).

Les granulations du bacille diphtérique se colorent en bleu foncé. Elles apparaissent volumineuses. Les contours du bacille sont colorés en violet foncé.

Il n'y a pas de rapport étroit entre la présence de granulations et la virulence ; les faux diphtériques peuvent présenter parfois une granulation. Cependant, le plus souvent, ils n'en présentent pas. La valeur de cette réaction, quoiqu'importante, est relative.

Diagnostic différentiel par la culture pour déterminer l'action fermentative sur les sucres. Recherche des porteurs de germes.

Le bacille diphtérique fait fermenter le glucose et le lévulose, jamais le saccharose ni la mannite. Les bacilles

pseudo-diphtériques ne font fermenter ni le glucose, ni le saccharose, ni la mannite. Il est commode de se servir des milieux différentiels suivants :

Milieu de Thiel :

Peptone, Nutrose, Glucose	āā 1 gr.
NaCl	0 5
Sol. de tournesol.	5 cc.
Eau.	100

Répartir en tubes qu'on ensemence avec chaque colonie suspecte, isolée à l'état pur. S'il y a fermentation, le tournesol rougit, la nutrose se précipite et le milieu se coagule.

Milieu de Rothe. — Mélanger 90 parties de bouillon-sérum (4 parties de sérum de bœuf et 1 de bouillon neutre) avec 10 parties de solution de tournesol contenant 1 p. 10 du sucre à étudier et préalablement stérilisée.

Ce milieu, en tubes ou coulé en boîtes de Pétri, est coagulé par la chaleur comme le sérum de bœuf simple. Il est particulièrement commode pour la recherche des porteurs de germes.

Le bacille diphtérique fait virer au rouge les tubes ensemencés contenant glucose et lévulose. Il ne fait pas virer ceux qui renferment du saccharose ou de la mannite.

Milieu de Drigalski et Bierast (recommandé).

A 600 centimètres cubes de sérum de bœuf, on ajoute 174 centimètres cubes de bouillon contenant 1 p. 100 de glucose, et 26 centimètres cubes de bile de bœuf pure préalablement filtrée sur papier Chardin.

Ce mélange est versé, à raison de 16 centimètres cubes environ, dans des boîtes de Pétri et coagulé vers 90 à 95°, à plat, puis stérilisé, trois jours de suite pendant une heure à 80°, comme le sérum gélatinisé ordinaire.

On frotte directement, à la surface de ce milieu, les tampons d'ouate qui ont servi à faire les prélèvements d'exsudat pharyngé : les colonies de bacilles diphtériques y sont déjà très apparentes après 16 heures à la température de 37°.

L. Martin et Loiseau ont montré que la culture en *milieu de Veillon* (gélose glucosée en tubes droits) permet de distinguer à coup sûr les vrais bacilles diphtériques des faux. Les vrais diphtériques se développent uniformément dans

toute la masse de gélose sucrée, sur toute la hauteur du tube, sans étalement à la surface, tandis que les faux diphtériques, au contraire, se développent abondamment à l'air libre et envahissent toute la surface du milieu en formant une couche crémeuse, épaisse.

Milieu de Costa, J. Troisier et Dauvergne. — Le procédé de ces auteurs permet d'isoler et de déterminer le germe à identifier. Il est basé sur les propriétés fermentatives que le bacille diphtérique exerce sur le glucose, alors que les faux diphtériques sont sans action. Le milieu est le suivant :

Sérum de cheval	100 cc.
Sol de glucose à 30 % stérilisée.	10 cc.
Teinture de tournesol concentrée et stérilisée.	XXX gtt.
Sol. d'acide sulfurique à 10 gr. p 1.000, stérilisée.	3 cc.

L'acide sulfurique a pour effet de saturer partiellement l'alcalinité naturelle du sérum. L'addition d'acide et de glucose ne change rien aux propriétés électives du sérum pour la culture du bacille diphtérique.

Tous ces produits, après mélange, sont répartis en boîtes de Pétri à fond régulièrement plat, à raison de 10 à 12 centimètres cubes par boîte. On coagule le milieu dans une étuve à sérum ou dans l'autoclave en élevant la température lentement et progressivement jusqu'aux environs de 80°. On l'y maintient pendant 1 heure 15. On rejette ensuite l'eau de condensation ; les boîtes peuvent être utilisées immédiatement.

Pour les ensemencer, on frotte une anse de platine triangulaire contre le coton ayant servi au prélèvement. On essuie l'anse sur toute la surface du milieu, par segments parallèles, sans la recharger.

Les boîtes ainsi ensemencées sont placées à l'étuve à 37°, le couvercle en dessous.

Après 24 heures, les colonies du bacille diphtérique ont les dimensions d'une tête d'épingle ; elles sont rouges au centre, roses à la périphérie. Vues par transparence à l'aide d'une loupe, elles donnent l'image de travées sous la forme d'une petite croix. Légèrement globuleuses, de consistance plutôt ferme, elles s'enfoncent dans le milieu à la façon de clous de tapissier.

Les colonies des bacilles diphtérimorphes sont opaques, blanc grisâtre et plus étalées.

Quelques heures plus tard, les colonies du bacille diphtérique restées circulaires ressemblent à une pustule variolique, tandis que les colonies des bacilles diphtérimorphes prennent une forme irrégulière, à bords dentelés.

Cet isolement doit être complété par l'examen des colonies rouges, les seules parmi lesquelles peut se trouver le bacille diphtérique.

*
* *

B. — Milieu de culture pour l'obtention de la toxine diphtérique.

Prendre 1 kilogramme de viande de veau qu'on passe au hache-viande et qu'on mélange à 2 litres d'eau. Laisser macérer pendant 20 à 24 heures à 36° au bain-marie (pour supprimer le glycogène, par fermentation).

Filtrer sur un linge, ajouter parties égales de bouillon de peptone L. Martin et 5 grammes de chlorure de sodium.

Stériliser pendant 45 minutes à 120°. Filtrer. Neutraliser exactement au tournesol. Alcaliniser ensuite en ajoutant *7 centimètres cubes par litre de solution de soude normale à 40 p. 100.*

Stériliser à 120° pendant 20 minutes. Filtrer et répartir dans de grands ballons à fond plat, en couche ne dépassant pas 3 centimètres cubes d'épaisseur, pour assurer une large aération en surface. Porter à l'étuve à 37° après ensemencement. Le bacille diphtérique doit se développer en voile sur ce milieu. On filtre les cultures à travers les bougies Chamberland (marque F), du septième au neuvième jour.

Pour entretenir les propriétés toxigènes du bacille diphtérique, il faut le réensemencer dans ce bouillon en tubes à essai *tous les deux jours.*

Le bacille toxigène de choix est le bacille dit *Américain* (isolé par *W. Park et William* à New-York), qu'on utilise dans presque tous les Instituts sérothérapiques.

Il est toujours prudent d'en conserver quelques semences sur sérum coagulé, en tubes scellés, à la glacière.

Pour rechercher la virulence des diverses souches de bacilles diphtériques, il est commode d'employer le procédé

de *Zingher* par injection intracutanée chez le cobaye : On épile la paroi abdominale et on injecte, à la dose de 0 cc. 15, une émulsion de culture de 24 heures dans l'épaisseur de la peau. Une inflammation nécrotique apparaît dans les 48 à 72 heures, s'il s'agit d'une race microbienne virulente.

*
* *

C. — Recherche de l'immunité antidiphtérique.

Se fait au moyen de la réaction de Schick : injection intradermique d'une dose très faible de toxine diphtérique.

Chez les sujets dont les humeurs contiennent de l'antitoxine, il ne se produit aucune réaction. La réaction est positive, quand il y a absence d'antitoxine, 24 heures après l'injection ; on constate un halo rouge induré qui augmente jusqu'à la 48e heure, puis diminue et disparaît dans la semaine suivante.

Chez l'homme et chez le cobaye, on injecte dans le derme, sous le volume de un dixième de centimètre cube, une quantité de toxine diphtérique égale au cinquantième de la dose mortelle en quatre jours pour un cobaye de 250 grammes. Il faut avoir une toxine titrée. Si la toxine tue par exemple au 1/700, le 1/50 de la dose mortelle est 1/35.000. Il faut donc ajouter 1/10 de centimètre cube d'une solution à 1/3.500. Faire la dilution avec de l'eau physiologique stérile dans des verres à pied stériles. Prendre par exemple trois verres dans lesquels on met respectivement 9 centimètres cubes dans le premier, 9 dans le second et 34 dans le dernier. Mettre dans le premier 1 centimètre cube de toxine pure (dilution au 1/10). On reporte 1 centimètre cube du premier dans le second (1/100) et 1 centimètre cube du second dans le troisième (1/3.500).

*
* *

E. — Anatoxine diphtérique. (G. Ramon.)

La toxine diphtérique additionnée de 3 à 4 p. 1.000 de formol et abandonnée à la température de l'étuve (37-38°) perd

peu à peu son pouvoir nocif mais conserve son pouvoir floculant. Une toxine très active, tuant par exemple à la dose de 1/800 de centimètre cube un cobaye de 300 grammes en 4 jours, se transforme ainsi finalement en un produit floculable en présence de la même quantité d'antitoxine que la toxine non modifiée, avec seulement un retard plus ou moins grand dans l'apparition de la floculation. Mais elle ne provoque plus, même à la dose de 6 centimètres cubes, ni lésions locales, ni symptômes d'intoxication précoces ou tardifs chez le cobaye. C'est ce produit antigène, atoxique, que Ramon a proposé d'appeler *anatoxine* diphtérique.

L'anatoxine diphtérique injectée à la dose de 1 centimètre cube, immunise le cobaye contre 50 et 100 doses mortelles ; deux injections successives de 1 centimètre cube d'anatoxine le protègent contre plusieurs milliers de doses mortelles. Elle convient parfaitement à l'hyperimmunisation des chevaux en vue de la production de sérum antitoxique. Après 2 injections de 1 centimètre cube, puis de 3 centimètres cubes à 7 jours d'intervalle, 1 centimètre cube de sérum est déjà capable de neutraliser 600 doses mortelles pour le cobaye. En répétant ensuite les injections d'anatoxine à doses croissantes, on constate une augmentation progressive de la teneur du sérum en antitoxine. La production d'antitoxine est la même qu'avec des quantités équivalentes de toxine, mais elle s'effectue en un temps beaucoup plus court (3 à 4 semaines) et avec un moins grand dommage pour les animaux, puisqu'il s'agit d'une substance dépourvue de toute toxicité.

L'anatoxine de Ramon est aujourd'hui employée pour vacciner activement les enfants et aussi les adultes exposés à contracter la diphtérie.

CHAPITRE XXXVII

BACILLE TUBERCULEUX. — PSEUDOTUBERCULOSES. LÈPRE. — MORVE.

I. — BACILLE TUBERCULEUX.

A. — Coloration du bacille tuberculeux dans les produits tuberculeux (crachats, pus, etc...).

a) *Méthode de Ziehl-Nielsen* (méthode de choix). — Les préparations de frottis ou de crachats, fixées par la chaleur, sont immergées dans un bain de *fuchsine de Ziehl* contenu dans un tube large, à recouvrement, de Borrel, ou dans tout autre récipient qu'on porte à l'étuve à 37° pendant deux heures. Ou bien, si l'on est pressé, on verse directement sur la lame quelques gouttes de colorant filtré et on chauffe sur la veilleuse d'un bec Bunsen ou au-dessus de la flamme d'une lampe à alcool, jusqu'à ce que le liquide émette des vapeurs, et ce, pendant au moins deux minutes.

On lave un instant à l'eau froide pour enlever l'excès de couleur et on verse sur la lame une dilution d'acide azotique (1 partie d'acide pour 3 parties d'eau distillée), ou bien une dilution d'acide acétique au tiers dans l'alcool à 95°. On laisse en contact 20 secondes ; on lave à l'alcool à 60° jusqu'à ce que la préparation soit bien décolorée. On la passe à l'eau.

On recolore pendant 30 secondes avec le *bleu phéniqué de Kühne*. On lave finalement à grande eau sous le robinet pendant 2 ou 3 secondes ; on sèche ; on laisse tomber sur la préparation une goutte d'huile à immersion et on examine directement, sans lamelle.

Si la lame doit être conservée, on la lave au xylol après l'examen pour enlever l'huile, et on sèche. Elle peut alors être reprise ultérieurement et recolorée s'il est nécessaire, car à la longue les bacilles se décolorent.

Les bacilles tuberculeux se détachent nettement colorés en *rouge* sur fond *bleu*.

Au lieu d'employer l'acide azotique au quart ou l'alcool acétique comme agent décolorant après l'action de la fuchsine phéniquée, on peut se servir d'une solution de chlorhydrate d'aniline à 2 p. 100 dans l'eau. Ce réactif est beaucoup moins brutal, moins nuisible aux éléments histologiques qui accompagnent le bacille tuberculeux. On le fait agir pendant environ 30 secondes, puis on achève de décolorer par l'alcool à 95° ; on lave à l'eau et on recolore au bleu de méthylène comme il a été dit ci-dessus.

b) *Méthode de von Betegh.* — Verser sur le frottis quelques gouttes d'acide azotique à 15 p. 100 et chauffer quelques instants.

Laver et colorer par un mélange à parties égales de bleu de méthylène alcalin de Lœffler et de fuchsine phéniquée de Ziehl. Chauffer de nouveau 1 à 2 minutes.

Décolorer par l'alcool à 60° et recolorer le fond pendant 1 à 2 minutes par une solution aqueuse saturée de vert malachite. Laver. Les bacilles apparaissent rouges et leurs granulations prennent une teinte bleu sombre sur fond vert.

c) *Méthode d'Herman.* — Colorer à chaud par un mélange de solution à 3 p. 100 de crystal-violet dans l'alcool absolu et de trois parties de solution aqueuse à 1 p. 100 de carbonate d'ammoniaque.

Décolorer 2 à 5 minutes dans l'acide azotique à 10 p. 100 ; laver à l'alcool à 90° jusqu'à coloration bleu pâle ; recolorer le fond soit avec la vésuvine, soit avec la safranine en solution aqueuse à 1 p. 100.

Les bacilles sont bleu intense, le fond rouge ou brun suivant le colorant de fond employé.

d) *Méthode de Much.* — (Pour les granulations gramophiles.) Colorer 24 à 48 heures par la solution suivante :

Sol. alcool. concentrée de violet de méthyle BN . . .	10 cc.
Sol. d'acide phénique à 2 p. 100.	100 cc.

Traiter 12 minutes par la solution iodo-iodurée de Gram-Lugol, puis sans laver, 1 minute par une solution à 5 p. 100 d'acide azotique et 10 secondes par une solution à 3 p. 100 d'acide chlorhydrique.

Laver à l'alcool-acétone (parties égales) jusqu'à ce que toute la couleur soit éliminée.

Recolorer avec une solution de fuchsine diluée ou par une solution aqueuse de safranine à 1 p. 100, 5 à 10 secondes. Laver à l'eau et sécher.

e) *Méthode de Fontès* (pour les granulations gramophiles). Colorer 2 minutes à chaud par la fuchsine de Ziehl. Laver à l'eau. Colorer au crystal-violet phéniqué, 2 minutes. Couvrir la lame (sans laver) de solution iodo-iodurée de Gram-Lugol qu'on verse et renouvelle 3 fois.

Traiter par l'alcool-acétone jusqu'à décoloration complète. Laver à l'eau. Recolorer rapidement au bleu de méthylène phéniqué. Laver à l'eau, sécher ; examiner dans l'huile à immersion. Le bacille, dans les cultures comme dans les crachats, paraît alors constitué de deux parties : une enveloppe protoplasmique teinte en rouge et des granulations colorées en violet foncé, en nombre d'autant plus grand que les bacilles sont plus âgés. Les jeunes bacilles ne présentent ordinairement qu'une seule granulation chromatophile centrale.

f) *Méthode de coloration des bacilles de Koch et de leurs granulations* (*Blanco*) :

1° Fixer la lame par la chaleur;

2° Colorer au Ziehl pendant 5 à 10 minutes en chauffant seulement une fois jusqu'à émission de vapeurs ;

3° Décolorer avec alcool absolu contenant 3 % d'HCl ;

4° Bien laver à l'eau ;

5° Différencier pendant 10 minutes avec une solution d'orange I obtenue en ajoutant 1 centimètre cube d'une solution aqueuse saturée de ce colorant à 99 centimètres cubes d'eau ;

6° Incliner la lame et colorer seulement la moitié inférieure de la préparation avec une solution faible de bleu de méthylène pour teindre le fond.

*
* *

B. — Coloration des coupes.

Fixer les pièces à l'alcool ou au formol. Traiter 2 à

5 minutes par l'hématoxyline pour colorer le noyau des cellules. Colorer au Ziehl deux heures à 37° ou 24 heures à la température du laboratoire. Décolorer au chlorhydrate d'aniline, puis à l'alcool à 95°; laver à l'eau, colorer le fond en jaune par l'acide picrique (solution alcoolique saturée).

*
* *

C. — Homogénéisation des crachats ou produits tuberculeux pour la recherche et la culture des bacilles.

a) *Procédé à la soude. — Méthode de Pétrof.* — Les crachats sont recueillis dans un flacon stérile à large goulot, fermé par un bouchon de caoutchouc. On les additionne ensuite de solution stérile de soude à 4 p. 1.000, parties égales si les crachats sont muqueux et fluides, ou 3 ou 4 parties de solution sodique pour une partie de crachats s'ils sont épais et purulents. On agite vigoureusement et on porte à l'étuve. Après une demi-heure on agite et on laisse de nouveau le mélange à l'étuve pendant 30 minutes. On centrifuge pendant un quart d'heure à grande vitesse, puis on décante le liquide. Si l'opération a été bien conduite, le sédiment doit se présenter sous l'aspect d'une pâte homogène, exempte de grumeaux. Pour rechercher les bacilles de Koch qu'il contient, on l'émulsionne dans une petite quantité d'eau physiologique et on l'étale sur des lames de verre préalablement lavées à l'acide chlorhydrique et séchées. On fixe par la chaleur et on colore ensuite suivant la méthode de Ziehl-Nielsen.

On peut également ensemencer, sur le milieu spécial de Pétrof dont il sera question plus loin, le culot de centrifugation des crachats traités par la soude. Pour cela, après avoir décanté la liqueur sodique comme il vient d'être indiqué, on émulsionne le sédiment dans 4 à 5 gouttes d'acide chlorhydrique à 5 p. 100. La réaction doit être légèrement acide ; on la vérifie en prélevant avec une fine pipette stérile une gouttelette de l'émulsion qu'on dépose sur du papier de tournesol bleu. Il ne reste plus qu'à ensemencer le sédiment sur trois ou quatre tubes de milieu spécial à l'œuf au moyen d'une pipette stérile et à porter à l'étuve à 37-38°, les tubes ensemencés, coiffés d'un capuchon de caoutchouc.

Suivant la richesse des crachats en bacilles, la culture apparaît du 8e au 15e jour sous l'aspect de petites colonies isolées ou confluentes, blanc jaunâtre, qui s'étendent peu à peu pour former une membrane presque continue, sèche, mamelonnée.

b) *Procédé à l'antiformine.* — On mélange, dans un flacon, 20 à 30 centimètres cubes de crachats ou de pus, ou de fèces avec la même quantité d'une dilution d'antiformine dans l'eau à 15 p. 100. On bouche le flacon et on agite fortement pendant quelques minutes. On laisse en contact 2 à 5 heures. On verse dans un ou plusieurs tubes centrifugeurs stériles. On centrifuge 10 minutes et on sépare, par décantation, le culot, pour l'étaler sur lames.

Pour éviter les mousses, on peut ajouter quelques centimètres cubes d'alcool ou quelques gouttes d'éther à l'antiformine avant d'agiter.

A défaut d'antiformine on peut employer l'eau de Javel ou la liqueur de Labarraque pure. Il faut alors prolonger le contact de 1 à 2 heures.

c) *Procédé de Bezançon et Philibert.* — A 5 centimètres cubes de crachats, on ajoute 25 centimètres cubes d'eau distillée et V gouttes de lessive de soude à 0,2 p. 100 (D : 1. 33) soit une goutte par centimètre cube de crachats. On chauffe doucement ce mélange à 60° dans une capsule de porcelaine en agitant constamment; on ajoute de nouveau 25 centimètres cubes d'eau distillée et on chauffe pendant 10 minutes. On laisse refroidir et on détermine la densité du mélange au moyen d'un densimètre gradué de 950 à 1.100. Si cette densité dépasse 1.004, on ajoute un peu d'alcool à 50° jusqu'à ce qu'elle soit retombée à 999 ou 1.000.

On prélève de quoi garnir 2 ou 4 tubes à centrifuger et on centrifuge pendant 3/4 d'heure ou pendant une heure. On décante le liquide et on étale le culot sur plusieurs lames de verre qu'on fixe et colore par la méthode de Ziehl-Nielsen.

d) *Concentration des bacilles tuberculeux dans les crachats fluidifiés à l'étuve (Bezançon, Mathieu* et *Philibert).*

On verse 5 à 10 centimètres cubes de crachats suspects dans un tube à essai que l'on porte à l'étuve à 37°. Les cra-

chats se fluidifient peu à peu pendant que les bacilles se déposent dans le fond du tube. La concentration atteint son maximum du 4e au 7e jour. On décante alors le liquide, on fixe par la chaleur et on colore, par les méthodes habituelles, le culot étalé sur des lames de verre. On peut également centrifuger toute la masse, décanter et étaler le culot.

*
* *

D. — Homogénéisation du sang pour la recherche des bacilles.

On extrait à la seringue, d'une veine du pli du bras, 10 centimètres cubes de sang qu'on projette aussitôt dans un tube contenant 10 centimètres cubes de solution stérile de citrate de soude à 2 p. 100 dans l'eau salée physiologique. On ferme le tube avec un bouchon de caoutchouc stérile ; on le retourne 3 ou 4 fois et on le porte à la glacière pendant 24 heures. On décante ensuite le liquide avec précaution et on recueille le sédiment à la pipette. Ce sédiment est étalé en couche épaisse sur lames de verre, séché à l'étuve, puis débarrassé des hématies par immersion dans l'eau distillée stérile, et coloré pour examen au microscope. On peut aussi le laquer par l'eau distillée, le centrifuger et inoculer le dépôt à des animaux.

*
* *

E. — Milieux de culture pour le bacille tuberculeux (pH : 6,8 à 7,2).

a) *Sérum de bœuf glycériné à 4 p. 100* et coagulé par chauffage à 72° en position inclinée ; la culture doit être faite dans une étuve bien réglée à la température constante de 38°.

b) *Pomme de terre glycérinée à 4 ou 5 p. 100.* — Dans des tubes de Roux, à étranglement. On remplit le tube, jusqu'à la partie étranglée, avec de l'eau glycérinée ou avec du bouillon glycériné, de telle sorte que l'extrémité de la tranche de pomme de terre touche au liquide.

c) *Bouillon ordinaire légèrement alcalin et glycériné à 4 ou*

5 p. 100. Sur ce milieu, le bacille tuberculeux doit être ensemencé avec précaution, en surface, au moyen d'un fragment de voile prélevé sur une autre culture jeune. Si la semence est noyée dans le liquide, la culture ne se développe pas.

d) *Bouillon de pomme de terre* (*Vaudremer*). — On fait bouillir 500 grammes de pommes de terre pelées dans un litre d'eau. On filtre. On ajoute de la soude jusqu'à réaction neutre au tournesol et on stérilise à 120° pendant une demi-heure. Les bacilles de Koch ensemencés sur ce milieu non additionné de glycérine forment un voile assez rapidement. Ils sont plus longs que les bacilles tuberculeux cultivés sur les milieux ordinaires, leur acido-résistance est faible surtout quand ils proviennent de la périphérie du voile.

e) *Milieu à l'œuf, de Dorset*. — On lave des œufs de poule à l'eau bouillie et on les brosse soigneusement. On les immerge pendant quelques minutes dans une solution phéniquée à 5 p. 100. On les saisit entre deux feuillets de papier buvard stérile. On flambe leurs deux pôles et, avec une pince pointue flambée, on pratique sur chacun de ces pôles (au-dessus de la flamme de la veilleuse d'un bec Bunsen), une ouverture. Au moyen d'un tube de caoutchouc stérile portant un filtre à coton stérilisé, on souffle par l'ouverture supérieure, de telle sorte que le contenu de l'œuf tombe de l'ouverture inférieure dans un matras d'Erlenmeyer stérile et préalablement taré. On introduit ensuite, dans le matras, une quantité d'eau stérile correspondant à 10 p. 100 du poids d'œuf et on agite pour assurer le mélange homogène du jaune, du blanc et de l'eau, sans faire de bulles d'air. On jette ensuite le tout dans un entonnoir portant une tarlatane stérile (sous un couvercle en papier buvard stérile) et on répartit aseptiquement la masse filtrée dans des tubes à essai. On coagule à 70° pendant 2 heures, en position inclinée, et on porte le tube à l'étuve à 37° pendant trois jours, afin de rejeter ceux qui seraient contaminés. On les obture ensuite avec des capuchons de caoutchouc et on les conserve en position verticale jusqu'au moment de leur emploi. Ce milieu convient à l'isolement des bacilles tuberculeux d'origine bovine. Le bacille humain n'y pousse que très faiblement.

f) *Milieu à l'œuf glycériné, de Lubenau*. — Même prépara-

tion en remplaçant l'eau de dilution de l'œuf par 30 p. 100 (du poids de celui-ci) de bouillon alcalin glycériné à 5 p. 100. Ce milieu permet la culture du bacille d'origine humaine.

g) *Milieu à l'œuf, de Pétrof.* — A 250 grammes de viande fraîche de veau, hachée au hachoir stérile, on ajoute 212 grammes d'eau distillée et 37 grammes 5 de glycérine stérile. On place le tout à la glacière pendant une nuit et on filtre sur gaze stérile.

On désinfecte ensuite les œufs frais en les immergeant pendant 15 minutes dans l'alcool à 70° et on les casse, en les manipulant avec des gants de caoutchouc stériles. Après avoir mélangé intimement blancs et jaunes et filtré sur gaze stérile, on ajoute 200 centimètres cubes de filtrat de viande à 400 centimètres cubes de filtrat d'œuf, et on additionne ce milieu de solution alcoolique de violet de gentiane à 1 pour 100 d'alcool à 95°, dans la proportion de 1 centimètre cube de solution colorante pour 100 centimètres cubes de milieu. Mélanger de nouveau et répartir en tubes.

Faire coaguler ensuite en position inclinée en chauffant à

85°	pendant	30	minutes	le premier jour
75°	—	30	—	le deuxième jour
75°	—	30	—	le troisième jour

Le milieu obtenu présente une belle coloration violette, homogène, qui permet d'observer facilement les colonies blanches ou jaunâtres du bacille tuberculeux. Il convient particulièrement à l'isolement de ce microbe à partir des crachats préalablement traités par la soude. Pour les repiquages ultérieurs, on utilise le même milieu non additionné de violet.

h) *Milieu de Heyden–Hesse :*

Nutrose de Heyden[1]	5 gr.
Eau.	50 cc.

après dissolution, ajouter :

Chlorure de sodium.	5 gr.
Glycérine.	30 gr.
Gélose.	10 à 20 gr.
Solution décinormale de soude. . . .	5 cc.
Eau distillée.	950 cc.

1. Le nutrose de Heyden provient de la fabrique Heyden, à Radebeul, près Dresde. On peut lui substituer la Somatose ou le Tropon.

Porter 15 minutes à l'autoclave à 100°, filtrer, stériliser à 115° en tubes contenant chacun la quantité de milieu nécessaire pour une boîte de Pétri.

(Convient plus particulièrement à l'isolement initial des bacilles tuberculeux.)

i) *Pomme de terre biliée* (*Calmette et Guérin*). — On immerge les tranches de pommes de terre coupées à l'emporte-pièce dans de la bile de bœuf pure, filtrée et stérilisée, à laquelle on a ajouté 5 p. 100 de glycérine. On porte le tout au bain-marie à 75° pendant 3 heures. Les pommes de terre sont ensuite réparties en tubes de Roux qu'on remplit jusqu'à l'étranglement avec de la bile pure glycérinée à 5 p. 100. On stérilise 30 minutes à 120°.

Sur ce milieu, le bacille tuberculeux donne des cultures très épaisses, abondantes, lisses et luisantes, de couleur café au lait et ressemblant aux cultures de morve.

j) *Milieux minéraux.* — *1° Milieu de L. Massol et M. Breton* :

Eau distillée	1 litre
Carbonate de soude	1 gr.
Sulfate ferreux	0 gr. 040
Sulfate de magnésie	0 gr. 050
Phosphate de potasse	1 gr.
Chlorure de sodium	8 gr. 5
Glucose	10 gr.
Glycérine	40 gr.
Asparagine	2 gr.

2° *Milieu de Sauton.*

Asparagine	4 gr.
Glycérine	60 gr.
Acide citrique	2 gr.
Phosphate bipotassique	0 gr. 5
Sulfate de magnésie	0 gr. 5
Citrate de fer ammoniacal	0 gr. 05
Eau	1.000 cc.

Après 20 jours de culture, le poids de bacilles secs obtenu sur ce milieu est de 1 gramme environ pour 100 centimètres cubes de liquide, tandis que sur le bouillon glycériné il n'est que de 0 gr. 65.

3° *Milieu d'Armand Delille, Mayer, Schaeffer et Terroine.*

Eau	200 gr.
Chlorure de sodium	1 gr. 25
Phosphate monopotassique	1 gr. 25

Citrate de magnésie.	0 gr. 60
Glucose.	1 gr.
Glycérine.	10 gr.
Glycocolle.	1 gr.
Arginine.	0 gr. 50
Solution de soude à 1 pour 100. . . .	1 cc. après neutralisation préalable.

En douze jours, les bacilles fournissent sur ce milieu un voile complet, épais, gaufré, grimpant le long des parois du vase.

*
* *

F. — Culture des bacilles contenus dans les crachats

Le milieu à l'œuf de Petrof et la gélose nutrosée de Heyden, ci-dessus indiqués, sont très favorables à l'isolement initial des bacilles tuberculeux contenus dans les crachats ou dans les organes.

La *méthode de Uhlenhut* à l'antiformine est également très recommandable.

Dans un flacon stérile, taré ou gradué à 100 centimètres cubes, on introduit 20 à 30 centimètres cubes de crachats, 15 centimètres cubes d'antiformine et une quantité d'eau distillée stérile suffisante pour porter le volume total à 100 centimètres cubes. On agite vivement pour bien mélanger et on laisse en contact 2 à 5 heures. On verse ensuite le liquide dans des tubes centrifugeurs stérilisés ; on centrifuge, on décante le liquide clair ; on lave une ou deux fois (en centrifugeant de nouveau) le culot avec de l'eau salée physiologique stérile ; on le recueille enfin et on l'ensemence sur plusieurs tubes de sérum gélatinisé glycériné, sur pommes de terre biliées glycérinées et sur les milieux différentiels à l'œuf, de *Dorset*, de *Lubenau* ou de *Besredka*. On porte à l'étuve à 37-38°.

*
* *

G. — Tuberculine.

a) *Préparation de la tuberculine brute de Koch.* — On stérilise à la vapeur à 100°, pendant une heure, des cultures de bacilles tuberculeux en bouillon glycériné à 4 p. 100, âgées

de 6 semaines. On les évapore ensuite au bain-marie dans des capsules de porcelaine jusqu'à réduction au 1/10 et on filtre le liquide concentré à travers un double filtre de papier épais (papier Chardin) qui retient la plus grande partie des corps microbiens. Une dose de 0 cc. 1 à 0 cc. 3 de cette tuberculine doit tuer en 6 à 24 heures les cobayes infectés depuis 4 semaines par l'injection sous-cutanée de 1 centigramme de bacilles tuberculeux, quantité ordinairement suffisante pour amener la mort de ces animaux en 8 à 10 semaines. A l'autopsie de ces cobayes on trouve, au point d'inoculation des bacilles et aux alentours, une infiltration rouge, œdémateuse qui s'étend aux ganglions correspondants. La rate, le foie, les poumons et l'intestin grêle présentent des taches de couleur rouge foncé ressemblant à des ecchymoses. Les capsules surrénales sont augmentées de volume et congestionnées.

b) *Tuberculine purifiée* (*Calmette et Massol*). — On obtient des produits faciles à purifier en partant de cultures en milieu liquide sans peptone, tel que celui dont la composition a été indiquée ci-dessus (milieu de Massol et Breton). On les concentre dans le vide à 45° jusqu'à réduction au cinquième du volume primitif. On précipite ce liquide par 20 volumes d'un mélange à parties égales d'alcool à 95° et d'éther sulfurique ; on redissout le précipité dans un faible volume d'eau et on le soumet, pendant 6 à 12 heures au plus, à la dialyse à l'eau distillée courante, froide, sur parchemin animal ; puis on précipite une deuxième fois par 10 volumes d'alcool absolu. La poudre blanche (tuberculine CL) qu'on en retire après dessiccation est environ dix fois plus active que celle fournie par la précipitation alcoolique de la tuberculine ancienne. Le rendement est d'environ 0 gr. 75 pour un litre de culture.

c) *Préparation des émulsions bacillaires pour l'inoculation des animaux de laboratoire.* — Il est indispensable de préciser, pour chaque expérience, le poids de microbes employés. Pour peser les bacilles, on prélève, avec une spatule de platine flambée, une petite quantité de culture qu'on essore par pression sur plusieurs feuillets de papier filtre et qu'on porte ensuite sur un petit carré de papier Chardin

taré, dans un verre de montre, à la balance de précision. On en prend ainsi 10 mgr. par exemple.

Ces bacilles sont ensuite introduits, avec la spatule, dans un petit ballon de verre de 100 à 150 cc., stérile et contenant des billes de verre de 2 à 3 millimètres de diamètre sur une hauteur de 1 centimètre environ. On agite vivement pendant 1 ou 2 minutes de façon à bien dissocier les microbes. On verse ensuite 1/2 cc. d'eau physiologique avec une pipette graduée stérile. On agite de nouveau pendant 2 ou 3 minutes et on ajoute 9 cc 5 d'eau physiologique en remuant constamment pour obtenir une émulsion bien homogène titrant 1 milligramme de bacilles par centimètre cube.

Pour préparer des émulsions titrant 0 mgr. 1, 0 mgr. 01, 0 mgr. 001, etc., par centimètre cube, il suffira de diluer, dans un verre stérile, 1 centimètre cube de l'émulsion mère dans 9 centimètres cubes d'eau physiologique, d'agiter soigneusement en aspirant et refoulant avec la pipette le liquide à plusieurs reprises dans le récipient ; puis de diluer 1 centimètre cube de cette émulsion titrant 0 mgr 1 par centimètre cube dans 9 centimètres cubes d'eau physiologique, et ainsi de suite.

On peut également préparer l'émulsion mère en déposant les bacilles dans un mortier d'agate stérile et en les dissociant peu à peu avec une solution stérile de carbonate de soude au dix-millième ajoutée d'abord goutte à goutte à la pipette, ou avec 2 ou 3 gouttes de bile de bœuf stérile, ou encore avec 2 ou 3 gouttes de jaune d'œuf frais. Mais le premier procédé donne des émulsions plus homogènes et plus pures.

*
* *

H. — Modes d'inoculation ou d'infection expérimentale des petits animaux de laboratoire.

a) *Inoculation du cobaye par voie péritonéale* (cultures ou produits suspects purs). — Le cobaye étant immobilisé par un aide, le ventre dirigé horizontalement en haut, on coupe les poils un peu à droite ou à gauche de l'ombilic sur une étendue de 2 à 3 centimètres carrés. On badigeonne de

teinture d'iode et, quand l'alcool est évaporé, on pique verticalement la peau et la paroi musculaire d'un coup sec, en faisant pénétrer l'aiguille d'environ 1 centimètre dans la cavité péritonéale. On s'assure que la pointe est mobile en tous sens, on pousse doucement l'injection, on retire l'aiguille et on touche de nouveau la petite plaie avec de la teinture d'iode.

Avec des bacilles de virulence moyenne injectés à la dose de 0 mgr. 1 pesés à l'état frais, la mort survient, en général, en 3 ou 4 semaines.

b) *Inoculation intravasculaire* (cultures pures). — Se fait très aisément, chez le lapin, dans la veine marginale de l'oreille. Chez le cobaye, on injecte les émulsions virulentes dans la veine saphène, la jugulaire ou la carotide mise à nu par section de la peau. Chez le rat et la souris, on choisira une des veines latérales de la queue et on injectera les émulsions bacillaires au moyen d'une aiguille très fine, semblable à celles qu'emploient les dentistes pour les injections intragingivales. L'injection intracardiaque est facilement réalisable chez le lapin et le cobaye (quantité maxima de liquide à injecter 1/2 à 1 centimètre cube suivant la taille pour ce dernier animal.

c) *Inoculation intracranienne* (voir chapitre xv).

d) *Inoculation par voie intraoculaire* (voir chapitre xv).

e) *Inoculation par instillation oculaire* (*Calmette, Guérin, Grysez*) (cultures et crachats). Le cobaye étant solidement immobilisé par un aide et tenu horizontalement, on écarte les paupières en les soulevant légèrement et, au moyen d'une pipette tenue à courte distance de l'animal, on dépose une goutte d'émulsion virulente dans le cul-de-sac conjonctival. On ferme ensuite doucement les paupières à deux ou trois reprises et on remet le cobaye en liberté.

f) *Infection par les voies digestives* (cultures et produits bacillifères). Mélanger les produits bacillifères à une petite quantité d'aliments, du pain de préférence. On peut aussi les faire absorber à la pipette en ouvrant légèrement la bouche et en faisant couler doucement le liquide contre la joue, vers la base de la langue qui doit rester libre (quantité ma-

xima de liquide : 1 centimètre cube pour le lapin ; 0 cc. 2 et 0 cc. 3 pour le cobaye). La sonde œsophagienne est employée quand on veut introduire directement les bacilles dans l'estomac. On se sert d'une sonde uréthrale de petit calibre en gomme ; les mâchoires de l'animal étant maintenues écartées au moyen de deux lacets plats, la tête dirigée en haut, on fait glisser doucement le bec de la sonde le long du voile du palais. On est sûr d'avoir pénétré dans l'œsophage si les mouvements respiratoires restent réguliers et s'il ne se produit pas d'effort de toux.

g) *Infection par voie transcutanée* (cultures et produits bacillifères). Raser une étendue variable de peau sur la partie supérieure du cou de telle sorte que l'animal ne puisse se lécher, et étendre, avec une spatule ou un tampon de coton fixé à l'extrémité d'une baguette, les produits virulents : culture, crachats ou tissus réduits en pulpe.

*
* *

I. — Réactions tuberculiniques diagnostiques.

a) *Réaction thermique.* — Parmi les petits animaux de laboratoire, le lapin sain supporte sans dommage jusqu'à 0 cc. 5 de tuberculine brute injectée dans la veine, en solution dans 4 cc. 5 d'eau physiologique. Chez les lapins tuberculeux, au contraire, l'injection intraveineuse de 0 cc. 01 à 0 cc. 02 de la même substance provoque une réaction thermique déjà manifeste vers la 3e heure et persistant pendant environ 12 heures en diminuant progressivement à partir de la 5e ou 6e heure. Une élévation de température supérieure à 0°8, persistant pendant 4 à 6 heures, autorise à conclure à l'existence de la tuberculose chez l'animal éprouvé. Une dose supérieure à 0 cc. 1, injectée par la même voie, est généralement mortelle pour le lapin tuberculisé depuis au moins trois semaines.

L'injection sous-cutanée donne des résultats peu satisfaisants dans le diagnostic de la tuberculose chez le lapin et le cobaye. La voie la plus favorable chez ce dernier animal est la voie péritonéale. On injectera 0 cc. 02 à 0 cc. 03 de tuberculine brute en solution dans 1 centimètre cube

d'eau physiologique et on prendra la température toutes les deux heures jusque vers la douzième heure. Une réaction thermique supérieure à 0°8 et persistant pendant 4 à 6 heures, à partir de la troisième, est l'indice de la tuberculose.

b) *Intradermo-réaction.* — Cette méthode consiste à injecter, dans l'épaisseur même du derme, une quantité donnée de tuberculine. Chez les animaux de laboratoire, le cobaye en particulier, *Ch. Mantoux* recommande l'épreuve de l'intradermo-réaction par l'inoculation d'une goutte de la solution mère, à 1 pour 10, de tuberculine précipitée de l'Institut Pasteur. La région d'élection est la face externe des pattes postérieures qu'on dépile préalablement. On fixe la peau contre le plan ostéo-musculaire sous-jacent entre les doigts et on injecte ensuite la solution dans le derme.

La réaction positive consiste en une infiltration œdémateuse du derme, blanche ou rosée, de 12 à 18 mm. de diamètre, accompagnée souvent d'une suffusion hémorragique. Elle atteint son complet développement 48 heures après la piqûre. Quand la réaction est négative, toute trace a disparu à la fin du deuxième jour.

D'après *Blanco*, la région des lombes ou des flancs conviendrait mieux. On la dépile au moyen d'un mélange à parties égales de sulfure de baryum et de carbonate de chaux et, le lendemain, on injecte dans le derme 0 cc. 1 d'une dilution au 1/5 de tuberculine ancienne de Koch en sérum physiologique (soit 0 cc. 02 de tuberculine brute). La réaction spécifique doit durer 48 heures et la rougeur doit être très apparente dans les 24 heures. Les réactions faibles ou fortes s'observeraient du 7e au 15e jour après l'infection.

c) *Cuti-réaction.* — Très inconstante dans ses résultats, cette méthode est peu employée pour le diagnostic de la tuberculose chez les petits animaux de laboratoire.

d) *Ophtalmo-réaction.* — Réussit mieux chez le lapin tuberculeux que chez le cobaye. On instille une goutte de tuberculine brute, ou une goutte de solution au 1/100 de tuberculine purifiée, dans l'angle interne de l'un des yeux de l'animal suspect. Quand la réaction est positive, on observe,

déjà après 5 ou 6 heures, un peu de rougeur de la conjonctive, puis l'œil devient larmoyant, l'inflammation de la muqueuse augmente et une sérosité trouble s'accumule dans le cul-de-sac conjonctival. Au bout de 2 jours, cette inflammation locale s'atténue puis s'efface.

*
* *

J. — **Réaction de sédimentation des globules rouges.**

— Dans le sang rendu incoagulable par addition de citrate de soude, les éléments figurés se sédimentent en 3 couches : les globules rouges dans la partie inférieure, les globules blancs dans la partie moyenne et le plasma citraté qui surnage. La rapidité de cette sédimentation varie selon les conditions physiologiques et pathologiques du sujet. Elle est fonction : 1° de la composition du milieu plasmatique et des proportions relatives de ses protéines ; 2° du nombre, du volume et de la composition physico-chimique des globules ; 3° de la tension superficielle, des forces capillaires et de la charge électrique des éléments en présence.

Technique de Fabreus-Westergreen. — Dans une seringue contenant une solution de citrate de soude à 3 p. 100, on recueille du sang par ponction veineuse dans la proportion de 1 partie de sang pour 4 parties de solution citratée. On agite le mélange et on en remplit, jusqu'à la marque 200 millimètres, des tubes de 300 millimètres de haut sur 2 mm. 5 de diamètre qu'on place ensuite verticalement. On examine après 1, 2 et 24 heures et on note les résultats. Chez l'homme normal, le niveau de sédimentation, à la fin de la première heure, est de 3 millimètres ; chez la femme, de 5 à 10 millimètres. Ces chiffres sont toujours plus élevés dans la tuberculose pulmonaire, et d'autant plus que son évolution est plus défavorable. Sans doute la méthode de sédimentation n'est-elle pas strictement spécifique ; cependant elle permet, dans certains cas douteux, d'exclure l'hypothèse de tuberculose pulmonaire ou la présence de lésions actives. Elle peut donc fournir des renseignements diagnostiques et pronostiques utiles.

*
* *

II. — PSEUDO-TUBERCULOSES.

A. — **Pseudo-tuberculose des rongeurs.** (*Lapins, Cobayes.*)

Tuberculose zoogléique de Malassez et *Vignal* (*Bac. pseudo-tuberculosis rodentium de Pfeiffer*) : *Streptobacille*, 2 cils terminaux spiralés.

a) *Coloration* facile par les couleurs basiques : thionine phéniquée. Ne prend pas le Gram.

b) *Culture.* — Aérobie et anaérobie, pousse à partir de 5° sur tous les milieux, glycérinés et surtout glucosés. Colonies ressemblant au *Bacterium coli*, grisâtres, molles, grasses, dégageant une odeur désagréable. Ne liquéfie pas la gélatine. Trouble le bouillon et l'alcalinise fortement en 8 à 14 jours en y formant des cristaux. Ne donne pas d'indol et n'est pas toxigène. Est tué par une heure de chauffage à 60°.

B. — **Pseudo-tuberculose des souris** (*B pseudotuberculosis murium, Kutscher*).

Immobile, prend le Gram, assez semblable au bacille diphtérique. Non sporulé.

Cultivable sur les milieux usuels. Donne, sur gélose glycérinée, des colonies jaunâtres. Ne liquéfie pas la gélatine. Pousse surtout abondamment sur le sérum coagulé glycériné. Trouble le bouillon et y forme des cristaux de phosphate ammoniaco-magnésien, bien reconnaissables au microscope (couvercle de cercueil). Ne donne pas d'indol ; ne coagule pas le lait ; ne pousse pas sur pomme de terre. Tué par chauffage à 60°.

C. — **Pseudo-tuberculose du mouton** (*B. de Preisz-Nocard*).

Immobile, prend le Gram ; assez semblable au bacille diphtérique. Donne, sur gélose, à 37°, des colonies écailleuses qui se développent rapidement et atteignent au bout

d'une semaine les dimensions d'une lentille, grisâtres. Ne pousse pas sur gélose glycérinée, pousse difficilement sur gélatine, mais croît abondamment sur gélose-ascite. Ne trouble pas le bouillon et y forme des petits flocons adhérents aux parois du vase.

Couche sèche blanc sale sur pomme de terre. Est tué par 10 minutes de chauffage à 65°, mais supporte plusieurs heures 55°. Facile à conserver longtemps vivant et virulent dans les milieux de culture. Pathogène pour souris, cobaye, lapin, chèvre et mouton.

III. — LÈPRE

A. — ***Bacillus lepræ*, de Hansen.** — Acido-résistant. Immobile. Colorable par toutes les méthodes qu'on emploie pour le bacille tuberculeux. Ses éléments renferment des granules (dits de *Babès-Ernst*) qu'on peut colorer par le bleu de méthylène, le brun de Bismarck ou la méthode de Much, et qui sont probablement constitués par des lipoïdes.

Les bacilles sont presque toujours intracellulaires, disposés en faisceaux, en amas ou buissons épineux très caractéristiques (globies), souvent entourés d'une matière mucilagineuse, formant capsule. Leur acido-résistance est moindre que celle du bacille tuberculeux, surtout dans les jeunes lépromes.

La *méthode de coloration de Baumgarten* permet de les distinguer des bacilles de Koch. Colorer à froid pendant 5 minutes avec le violet aniliné, après fixation des frottis par la chaleur. Décolorer avec :

Alcool absolu.	10 cc.
Acide nitrique.	1 cc.

Laver et sécher. Le bacille de Koch n'est pas coloré tandis que le bacille de Hansen est coloré en violet.

Coloration des coupes. — Faire agir successivement : glychémalun 5 minutes ; laver, fuchsine de Ziehl 5 minutes ; laver, et picro-indigo carmin pendant une minute. Laver à l'eau puis à l'alcool, décolorer par l'essence de girofle, arrêter la décoloration par le xylol. Monter au baume. Les

noyaux sont colorés en violet, les hématies en jaune, le tissu conjonctif en bleu, les bacilles en rouge.

La *méthode de Fick* est très recommandable : elle consiste à colorer pendant 20 à 25 minutes, à froid, dans une solution forte de fuchsine (phéniquée à 2 gr. 5 p. 100) ; on lave ensuite à l'eau, puis dans l'alcool à 95° pendant 15 secondes, on traite par le vert d'iode à 1 p. 100 (dissous dans de l'eau phéniquée à 2 p. 100) pendant 2 minutes ; on passe à l'alcool absolu jusqu'à ce que la coloration verte apparaisse, puis dans le xylol, et on monte dans l'huile de cèdre.

Les crachats, les exsudats naso-pharyngiens et les lépromes peuvent être avantageusement *dissous par l'antiformine* pour la mise en évidence des bacilles lépreux.

On traite des crachats pendant 15 minutes à 2 heures, les fragments de léprome broyés pendant 2 à 18 heures, par une dilution à 25 p. 100 d'antiformine ; on agite à diverses reprises, on centrifuge et on lave plusieurs fois le dépôt à l'eau physiologique, puis on l'étale sur lames pour fixer et colorer. Il est possible de découvrir ainsi, dans les produits d'expectoration, les bacilles lépreux qui passent inaperçus lorsqu'on n'emploie que les méthodes d'examen direct.

On peut par ce moyen se procurer en assez grande abondance des bacilles lépreux pour faire des essais de culture ou pour préparer des extraits pouvant servir d'antigène.

Pour le diagnostic bactériologique des lépromes, la meilleure technique consiste à piquer la tumeur, non pas avec une aiguille, mais avec une pointe de pipette effilée, en verre, en aspirant fortement par l'extrémité opposée bouchée à l'ouate. On obtient ainsi une goutte de sérosité qui, étalée en frottis, se montre habituellement très riche en bacilles, tandis qu'une gouttelette de sang prélevé par piqûre à l'aiguille n'en montre que très rarement.

La culture du bacille lépreux *en série* sur des milieux artificiels n'a pas encore pu être réalisée.

La spécificité des cultures doit être authentifiée : 1° par leur aptitude à servir d'antigène et à fixer l'alexine dans la réaction de Bordet-Gengou en présence de sensibilisatrices contenues dans le sérum des lépreux ; 2° par leur aptitude à produire chez les lépreux des réactions locales analogues

à celles que l'on obtient avec les cultures tuées de bacilles tuberculeux ou avec les tuberculines.

*
* *

B — ***Le bacille de la lèpre des rats***, de *Stefansky*, ressemble beaucoup au bacille lépreux. Il est également acido-résistant, intracellulaire, et se trouve parfois en nombre immense dans les cellules endothéliales vasculaires, dans les ganglions lymphatiques, la rate et la peau.

*
* *

C. — ***Le bacille de l'entérite chronique pseudotuberculeuse du bœuf***, de *Johne*, est également très voisin : acido-résistant, intracellulaire, il est cultivable sur les milieux glycérinés additionnés d'extrait glycériné de bacilles de la fléole. On émulsionne 1 gramme de bacilles de la fléole secs dans 20 centimètres cubes d'eau physiologique à 8 pour 1.000, glycérinée à 4 p. 1.000. On porte l'émulsion à l'autoclave, on chauffe à 120° pendant une heure et demie et on filtre sur papier. On ajoute ensuite 100 centimètres cubes de ce filtrat à 300 centimètres cubes de milieu à l'œuf, glycériné à 5 p. 100, préparé en mélangeant intimement blancs et jaunes aussi aseptiquement que possible (voir la préparation du milieu de Pétrof au chapitre tuberculose). Après avoir agité, on répartit ce milieu dans des tubes stériles qu'on chauffe au bain-marie à 60° pendant une heure, trois jours de suite. Finalement on coagule en position inclinée dans l'appareil spécial et, après les avoir capuchonnés, on éprouve la stérilité des tubes en les laissant à l'étuve à 37° pendant 2 jours.

*
* *

IV. — MORVE.

Bacillus mallei. — Immobile, non sporulé.

a) Coloration. — Toutes les couleurs basiques. Ne prend pas le Gram. La thionine phéniquée convient très

bien mais l'action des matières colorantes doit être un peu prolongée. Le bleu de méthylène, suivi de lavage rapide par l'acide acétique dilué à 0,5 p. 100 et du traitement par la solution à 10 p. 100 de tanin pour différencier (suivant le procédé de *M. Nicolle*), est aussi excellent.

La double coloration dans les tissus est difficile à obtenir. On peut employer, à cet effet, le mélange de Gorini : 1 partie d'eau saturée de bleu de méthylène, 1 partie de solution d'éosine à 0.5 p. 100 dans l'alcool à 70°, 2 parties d'eau.

Les frottis se colorent en quelques minutes ; les coupes en 1 heure environ.

b) Culture. — Se développe de 25 à 45°. L'addition de 4 à 5 p. 100 de glycérine aux divers milieux est très favorable. Bouillon de viande de bœuf, de veau ou de cheval neutre ou très légèrement alcalin. Trouble dès 24 heures après l'ensemencement ; anneau muqueux adhérent au verre à la surface du liquide et celui-ci se couvre bientôt d'une membrane analogue à celle que forme le bacille tuberculeux mais plus lisse et plus grasse. Cette membrane se dissocie, se dépose au fond du vase et se reforme plusieurs fois si on laisse longtemps la culture à l'étuve.

Le bacille de la morve pousse également bien sur sérum coagulé glycériné et sur gélose glycérinée. Mais la pomme de terre glycérinée est le milieu qu'il convient de choisir en tous cas. Il s'y développe rapidement et forme une couche crémeuse, luisante, d'abord jaunâtre, qui prend après 6 à 8 jours une teinte brique et qui brunit à la longue.

Les pommes de terre ne doivent jamais être acides car la moindre trace d'acidité empêche la culture. Il est donc nécessaire d'en faire tremper les fragments pendant une heure, avant la mise en tubes, dans une solution de bicarbonate de soude à 0,5 ou 1 p. 100.

Les pommes de terre gelées, qui sont plus ou moins sucrées, sont également inutilisables.

Le lait est lentement coagulé sans formation d'acide. Les cultures sur gélose ou sur pommes de terre doivent être réensemencées tous les mois, car elles sont assez fragiles. Après 3 ou 4 jours d'étuve, il est préférable de les garder dans une armoire à l'obscurité et à la température du laboratoire.

Le jaune d'œuf coagulé, en tubes inclinés, constitue un excellent milieu de culture. Au contraire, le blanc d'œuf ne convient pas.

Le bacille morveux chauffé à 58° est tué en 1 heure à 1 heure et demie ou en 5 minutes à 80°. Il se conserve trois mois environ vivant et virulent dans les cultures en gélose glycérinée, en tubes scellés maintenus à la glacière après développement à l'étuve.

Les cultures en bouillon âgées d'un mois et stérilisées à 110°, puis évaporées au bain-marie, permettent d'obtenir la *malléine*. Les bacilles tués sont eux-mêmes très toxiques. (Voir les travaux de *M. Nicolle* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* 1906 et 1907.)

L'isolement du bacille morveux est difficile à faire en partant des lésions morveuses du cheval ou de l'homme, à cause des infections microbiennes associées. Pour l'obtenir, il faut inoculer d'abord un cobaye sous la peau de la cuisse avec une petite quantité d'émulsion du produit suspect. Si ce produit renferme des bacilles morveux, les ganglions inguinaux voisins se tuméfient au bout de quelques jours. On enlève alors par excision un de ces ganglions (dont on peut effectuer l'examen microscopique immédiat en coupes et frottis); on le broie aseptiquement, on l'émulsionne dans un peu d'eau physiologique stérile et on l'injecte dans le péritoine d'un cobaye mâle. On voit bientôt (en 5 à 6 jours) apparaître chez cet animal une vaginalite morveuse (sarcocèle) dont il est facile alors d'extraire à la pipette, après avoir sacrifié le cobaye, de la sérosité plus ou moins riche en éléments microbiens. On ensemence directement cette sérosité sur plusieurs tubes de pommes de terre glycérinées qu'on porte à l'étuve à 37°. La culture est déjà très abondante en 5 à 6 jours.

Animaux sensibles. — Cobaye, chat, mouton. L'âne est hypersensible. Viennent après lui : le cheval, le mulet, l'homme et les grands carnassiers (lion, tigre, léopard). Les bovidés sont réfractaires.

Le lapin est peu sensible à l'inoculation sous-cutanée, mais il prend très bien la morve aigue par inoculation intraveineuse, et sa rate, ainsi que le sang du cœur, peuvent alors servir à ensemencer les milieux de culture liquides destinés à la préparation de la malléine. L'inoculation intra-

péritonéale des produits morveux au cobaye provoque une vaginalite caractéristique (signe de Strauss). La mort survient en 8-15 jours.

Le chien est peu sensible. Il en est de même du porc et du rat. La souris est réfractaire mais devient sensible si on lui injecte au préalable un peu de phloridzine pour la rendre diabétique.

Les oiseaux sont réfractaires.

L'homme est très réceptif.

Diagnostic de la morve par l'agglutination. — Il est commode d'employer, comme émulsion agglutinable, une émulsion de culture sur gélose glycérinée tuée par 30 minutes de chauffage à 60° et additionnée de 0,5 p. 100 d'acide phénique. La culture doit être préalablement broyée au mortier d'agate et émulsionnée dans de l'eau salée physiologique stérile, puis diluée jusqu'à former un liquide blanchâtre, laiteux, qu'on filtre rapidement sur un mince tampon d'ouate hydrophile mouillée. L'émulsion ainsi préparée peut se conserver plusieurs semaines.

Il faut savoir que l'agglutinabilité des cultures de morve est très variable suivant leur origine, et s'en tenir à une souche dont l'agglutinabilité est connue.

L'épreuve de l'agglutination se fait comme pour les sérums de typhiques. Les sérums normaux de cheval agglutinent souvent jusqu'à 1 p. 300, mais pas davantage ; celui de l'homme sain à 1 p. 500. Le sérum des morveux agglutine à des taux variant de 1 p. 1.000 à 1 p. 10.000. Les tubes doivent être maintenus pendant 30 minutes à 37° avant la lecture des résultats.

Les sérums de volailles (poule, canard, pigeon, oie) agglutinent normalement le bacille morveux à 1 p. 1.000, quelquefois davantage.

La malléination préalable du cheval sain n'influence pas le pouvoir agglutinant de son sérum.

Diagnostic de la morve par la précipitation. — On procède comme dans la méthode d'Ascoli (voir bactéridie charbonneuse) par superposition de l'antigène (malléine au 1/10 dans l'eau physiologique), au sérum anti, chauffé à 55°. On laisse à la température du laboratoire et on note les résultats après 18-20 heures. Méthode de peu de valeur, beaucoup de sérums normaux précipitant au contact de la malléine.

Diagnostic de la morve par la déviation du complément. — La technique générale de *Calmette et Massol* est également applicable au diagnostic de la morve par la déviation du complément. La malléine diluée à 1 p. 5.000, employée comme antigène (*Ciuca*), donne des résultats inconstants. Les émulsions de corps microbiens préparées de la manière suivante (*Brocq-Rousseu, Forgeot* et *Urbain*) la remplacent avantageusement :

a) On émulsionne 2 centigrammes de bacilles morveux tués dans 20 centimètres cubes d'eau physiologique et on centrifuge à deux reprises en décantant chaque fois le liquide surnageant qui est remplacé par un égal volume d'eau physiologique. La suspension microbienne est ensuite portée pendant 5 minutes à l'ébullition. Cet antigène est employé à la dose de 3/10 de centimètre cube par tube dans la réaction de fixation.

b) L'antigène préparé avec des bacilles morveux traités par l'alcool-éther a la même activité que le précédent. Il offre l'avantage de se conserver indéfiniment lorsqu'il est maintenu à l'abri de l'humidité. Les cultures de bacilles morveux en bouillon glycériné, âgées de 6 jours, sont stérilisées par un chauffage de deux heures au bain-marie à 60°. On centrifuge ensuite et on lave à deux reprises les corps microbiens dans l'eau physiologique. Finalement on déshydrate le culot par l'alcool et on ajoute une quantité égale d'éther. On laisse agir le mélange alcool-éther pendant 24 heures, puis on décante le liquide et on fait dessécher les corps microbiens à l'étuve ou sous la cloche à vide. Quand ils sont bien secs, on les broie dans un mortier d'agate ou bien dans un tube métallique garni de billes de bronze. Pour la recherche des anticorps morveux, on les émulsionne à raison de 1 centimètre cube pour 50 centimètres cubes d'eau physiologique et on emploie 3/10 de centimètre cube de cette émulsion par tube.

La malléine, injectée sous la peau, fait apparaître des anticorps chez les chevaux sains. Si l'on associe la malléination à la déviation du complément, il convient de prélever le sang avant ou dans les 3 jours qui suivent la malléination (*Brocq-Rousseu, Forgeot* et *Urbain*).

CHAPITRE XXXIX

MYCOSES.

A. — **Procédés d'examen.**

Les procédés varient avec le matériel à examiner. L'examen direct des champignons, sans coloration, après dissociation, se fait soit dans le *lactophénol de Amann*, soit dans le *liquide de Pinoy*.

Lactophénol de Amann :

Acide phénique cristallisé pur.	1 gr.
Acide lactique.	1 gr.
Glycérine.	2 gr.
Eau distillée.	1 gr.

Liquide de Pinoy :

Hydrate de chloral.	40 cc.
Glycérine.	20 cc.
Eau.	20 cc.
Sol. alcoolique d'acétate de plomb à 2 %. .	10 cc.

Examen des squames épidermiques et des poils pour la recherche des champignons parasites. — Les squames ou poils sont déposés sur une lame, lavés à l'éther, puis immergés dans une goutte de solution de potasse caustique à 40 p. 100, recouverte d'une lamelle, et portés à 100° sur la flamme de la veilleuse, pendant 15 à 20 secondes. La préparation est alors éclaircie. On peut l'examiner. Ou bien la laver et colorer 24 heures dans une solution alcoolique saturée de *bleu de méthylène* étendue de moitié d'eau; laver à l'eau soigneusement ; faire agir la solution de Gram pendant 5 minutes ; laver à l'eau. Décolorer par le mélange de :

Xylol.	1 cc.
Huile d'aniline.	2 cc.

Laver au xylol pur et monter au baume.
(*Favus*, *Teignes*, *Trichophyties*.)

On peut aussi examiner à froid les poils parasités dans le chloral-lactophénol composé de :

Hydrate de chloral cristallisé. . . .	2 parties en poids
Acide phénique cristallisé.	1 »
Acide lactique.	1 »

Ce procédé est plus simple que celui de la potasse et éclaircit suffisamment.

Pour les dermatomycoses (*Pityriasis versicolor* et *Erythrasma microsporoides minutissimus*), dissocier les squames épidermiques dans une goutte d'acide acétique glacial, laisser sécher et fixer à l'alcool absolu, puis colorer à chaud avec le bleu de toluidine à 1 % et différencier à l'essence de girofle, colorer le fond à l'éosine : le parasite est coloré en bleu violacé.

Pour le *Muguet,* colorer au violet de gentiane phéniqué.

Pour l'*Actinomycose*, traiter le produit de raclage par la potasse à 40 p. 100, laver et colorer par la méthode de Gram, puis par l'éosine qui colore les massues en rose, alors que les filaments prennent la couleur violette (voir ch. VII).

Préparation des moisissures. (*Méthode de Pinoy.*) — Choisir une très jeune fructification. La saisir par la base au moyen d'une pince à pointes fines et la poser sur une lame.

Déposer sur la lame, auprès de la moisissure, une goutte d'alcool ammoniacal et l'amener au contact de la moisissure au moyen d'une pointe d'aiguille. L'alcool commence à mouiller la moisissure et permet aux liquides employés ultérieurement de pénétrer les tissus.

Faire agir ensuite le *liquide de Flemming* :

Acide osmique à 2 p. 100.	4 cc.
Acide chromique à 1 p. 100.	15 cc.
Acide acétique.	1 cc.

Laver à l'eau. Appliquer une lamelle sur la préparation et examiner.

Si l'on veut obtenir une préparation persistante, remplacer l'eau par de la glycérine ; on dépose une gouttelette de glycérine d'un côté de la lamelle et on absorbe l'eau du côté opposé avec une bandelette de papier buvard. On borde ensuite à la paraffine.

Gommes ramollies, pus. — Examen direct entre

lame et lamelle, la réfringence des filaments mycéliens permet de voir ces éléments. Si l'examen est négatif, faire, après fixation, une coloration par la méthode de Gram.

Grains des mycétomes. — Examen direct après dissociation dans le lactophénol. Après fixation, faire des inclusions et des coupes.

Bronchomycoses. — Examen direct et après, coloration des crachats par la méthode de Gram.

*
* *

B. — **Milieux de culture des champignons.**

Pour l'isolement des champignons deux milieux sont suffisants : 1° la carotte préparée suivant la technique indiquée pour la pomme de terre ; 2° la gélose maltosée de Sabouraud.

a) *Milieu d'épreuve de Sabouraud* :

Eau	1000 cc.
Gélose	18 gr.
Maltose brute de Chanut.	40 gr.
Peptone granulée de Chassaing.	10 gr.

Mêler le tout dans un ballon ; porter à l'autoclave et monter lentement avec une couronne de gaz jusqu'à 120°, éteindre et laisser descendre. Agiter en sortant de l'autoclave, filtrer à chaud sur papier Chardin, répartir en tubes ou en fioles, boucher au coton. Stériliser à l'autoclave en montant lentement jusqu'à 120° et éteindre.

b) *Milieu de conservation de Sabouraud.*

Même formule que ci-dessus en supprimant les hydrates de carbone.

Examen des cultures de champignons. — Prélever un fragment de la culture à examiner, le dissocier délicatement dans le lactophénol et examiner entre lame et lamelle.

Dessiner les mycéliums, les formes de reproduction, l'aspect de l'appareil sporifère, les dimensions des spores et fixer leurs dimensions respectives.

*
* *

C. — Etude du développement des champignons.

Trois procédés peuvent être employés :

1° *Méthode des gouttes pendantes de Van Tieghem.*

Sur des lames de verre, on fixe, avec le lut de Krönig, des petits anneaux de verre ayant environ un centimètre de hauteur. Une fois que le lut est sec, on stérilise le fond et les parois de ces cellules en les passant dans la flamme d'un bec Bunsen. Quand elles sont refroidies, on enduit la partie supérieure de ces anneaux de verre d'une légère couche de vaseline au sublimé à 1 %. Flamber ensuite une lamelle tenue avec une pince, déposer sur une de ses faces 1 goutte de jus de carotte et la placer sur la tranche vaselinée de l'anneau, la goutte vers l'intérieur de la cellule.

Pour ensemencer une spore, faire une dilution des spores dans une petite quantité d'eau physiologique stérile contenue dans un verre de montre flambé. Porter sur une lame flambée 1 goutte du liquide que l'on étale suivant 2 ou 3 stries, chercher au microscope un point où il n'y a qu'une spore, la reporter avec une pipette dans la goutte de jus de carotte en soulevant et retournant la lamelle que l'on place sur la cellule après ensemencement. Pour empêcher l'évaporation de la goutte, on place les cellules dans la cloche de Malassez garnie à l'intérieur de papier buvard trempé dans une solution de sublimé au millième qui empêche les contaminations secondaires de la goutte.

2° *Procédé de la boîte de Pétri.*

Placer 2 ou 3 lames flambées dans une boîte de Pétri stérile, en les isolant du fond par de fines baguettes de verre. Verser un peu d'eau stérile au fond de la boîte. On dépose ensuite, sur chaque lame, une goutte de jus de carotte dans laquelle on ensemence une spore, puis on replace le couvercle de la boîte.

3° *Procédé des lames sèches.*

On dispose verticalement dans un cylindre de Borrel 3 lames maintenues séparées par un triangle en baguettes de verre. Verser dans le cylindre, sur une hauteur de 1 centimètre environ, le liquide suivant :

Eau	100 cc.
Glucose	2 gr.
Peptone	1 gr.
Glycérine	2 gr.

Boucher avec un tampon de ouate, coiffer d'un cornet de papier et stériliser à l'autoclave.

On mouille une partie des lames avec le liquide, en inclinant légèrement le cylindre et on ensemence les spores dans la partie du liquide qui reste sur la lame.

Pour examiner au microscope, remplacer le liquide de culture par une goutte de lactophénol qu'on recouvre d'une lamelle. En lutant la lamelle avec le lut de Krönig, on peut conserver des préparations montrant tous les stades de développement du champignon.

*
* *

D. — Inoculation des champignons.

Inoculer la culture du champignon à des animaux sensibles (lapin, rat, souris, pigeon) en variant les modes d'inoculation : sous-cutanée, intraveineuse, intratesticulaire (sporotrichose), dans les bourses plantaires du métatarse du pigeon, etc...

*
* *

E. — Sporotrichose.

a) *Coloration.* — Toutes les couleurs basiques. Prend le Gram. Formes ovales ou en fuseau, intra ou extracellulaires, ordinairement contenues dans les macrophages mononucléaires ; toujours rares dans le pus. Formes allongées, disposées en faisceaux ou étoiles avec conidies portant un bouquet de 2 à 30 spores ovoïdes dans les cultures. Chlamydospores sur la longueur des filaments.

b) *Culture.* — Sur tous les milieux glucosés. Ne liquéfie pas la gélatine non glucosée, liquéfie la gélatine glucosée et forme des colonies brunes.

Le milieu de choix est celui de *Sabouraud* :

Gélose	10 gr.
Peptone Chapoteaut	10 gr.
Glucose	40 gr.
Eau	1.000 cc.

Cultiver à la température du laboratoire, sur plaque de Pétri. Optimum de température, 22 à 30°.

Pour le diagnostic, *de Beurmann et Gougerot* recommandent le simple coulage du pus sur verre sec (à l'intérieur d'un couvercle de boîte de Pétri). Maintenir à 22°. Les formes mycéliennes caractéristiques, en étoiles, se développent en quelques jours.

c) *Sporo-agglutination.* — On broie à sec, dans un petit mortier d'agate, un grumeau de culture âgée de 4 à 6 semaines et on délaie avec quelques gouttes d'eau physiologique. On filtre sur papier mouillé pour retenir le mycélium. Les spores traversent le papier. On recueille le liquide et on le répartit dans une série de verres de montre à la dose unique de 1 centimètre cube. On ajoute ensuite, à chaque verre de montre, des quantités progressivement croissantes de sérum du malade suspect (sérum dilué à 1 p. 10 avec une eau salée physiologique), 1 goutte, 2 gouttes, etc... Après quelques minutes on prélève une goutte de chaque mélange et on examine entre lame et lamelle. On peut déterminer ainsi le taux de l'agglutination qui varie de 1 p. 100 à 1 p. 500.

d) On peut utiliser la technique de Bordet-Gengou pour la fixation du complément en employant 1 centimètre cube du sérum à éprouver, 0 cc. 5 d'émulsion de Sporotrichum (non filtrée), 0 cc. 2 de sérum frais de cobaye et 0 cc. 7 d'eau salée physiologique pour chaque tube. On laisse 4 heures à l'étuve à 37°. puis on ajoute 0 cc. 3 de sérum de lapin anti-chèvre inactivé et 0 cc. 5 d'hématies lavées de chèvre (diluées à 5 p. 100 dans l'eau salée physiologique).

Les macérations de cultures de Sporotrichum, tuées par chauffage à 120°, peuvent aussi servir au diagnostic par sporo-cutiréaction, comme la tuberculine dans la tuberculose, mais ces réactions ne sont pas absolument spécifiques.

*
* *

F. — Actinomycose.

a) *Coloration.* — Dans les coupes, les massues se colorent très bien avec le picrocarmin, l'hématoxyline-éosine, l'orcéine, et les filaments par le Gram. On traitera d'abord par le violet de gentiane, puis par la solution de Lugol, puis par le picrocarmin dans lequel les coupes se décolorent partiellement. On lave ensuite à l'eau, puis à l'alcool absolu jusqu'à ce que l'excès de violet disparaisse et que les coupes présentent une teinte jaune rougeâtre.

On peut aussi laisser les coupes immergées pendant 4 à 5 heures à l'étuve à 37° dans une solution alcoolique concentrée d'éosine, puis on les lave à l'alcool à 95° et on les colore pendant environ 5 minutes par l'hématéine de Mayer. On lave ensuite longuement en suivant la décoloration au microscope, jusqu'à ce que la teinte éosine ne soit plus intense. Les massues sont rouges tandis que les éléments cellulaires environnants ont pris la double coloration.

On peut également employer la thionine phéniquée de M. Nicolle ou la méthode de Ziehl telle qu'elle est utilisée pour la coloration du bacille tuberculeux, avec le bleu de méthylène comme colorant de contraste.

Pour les cultures, la méthode de Gram est très commode.

b) *Culture.* — Les premières cultures sont difficiles à obtenir. Il faut broyer finement un fragment de tumeur contenant des grains actinomycosiques dans un mortier d'agate stérile, avec un peu de bouillon, et ensemencer un grand nombre de tubes de gélatine fondue qu'on coule en plaques et qu'on maintient à la température de 22°.

Les colonies apparaissent au bout de 5 à 6 jours sous forme de petits points grisâtres ; il faut les reporter aussitôt sur gélose et sur sérum coagulé.

En 24 heures, à l'étuve à 37°, les colonies se montrent et forment bientôt de petits amas saillants, granuleux, blanchâtres. Au bout de deux semaines, elles deviennent confluentes, sèches, jaune rougeâtre ou brique et sont formées de nodules adhérents à la profondeur de la gélose. A l'exa-

men microscopique, on ne voit que des filaments fins, ramifiés. On peut les réensemencer facilement dans le bouillon alcalin où elles se développent en petites houppes autour d'un noyau dense. Le bouillon reste limpide. Elles poussent aussi très bien, mais plus lentement, sur pomme de terre et y prennent une couleur jaune rougeâtre. Elles peptonisent lentement le lait. Leur température optimum de croissance est de 33 à 37°. Elles résistent longtemps à la dessiccation, mais le chauffage à 75° les tue en 5 minutes.

Les tumeurs actinomycosiques s'observent chez l'homme, le bœuf, le porc, le cheval, l'âne, beaucoup plus rarement chez le chien, le chat, le mouton, le cerf, l'ours et l'éléphant.

*
* *

G. — Pied de Madura.

Il en existe plusieurs variétés. L'isolement est assez difficile. Il faut puiser, avec une pipette stérile, à l'intérieur d'un nodule ulcéré, préalablement lavé à l'éther, puis à l'alcool iodé, et ensemencer dans un bouillon légèrement alcalin. Les cultures apparaissent lentement, après deux semaines environ, sous forme de nodules arrondis, grisâtres, qu'on réensemence ensuite sur pomme de terre, sur carotte et mieux dans un milieu constitué par 100 centimètres cubes d'infusion de foin additionnée de 4 grammes de gélatine et 4 grammes de glucose. On obtient ainsi un bon développement sur gélose glycérinée glucosée. Les colonies, d'abord grisâtres, deviennent confluentes, volumineuses, rouges à la périphérie, grises ou noirâtres au centre, ratatinées et plissées. Elles croissent lentement mais sont résistantes à la dessiccation et restent vivantes pendant des mois. A l'examen microscopique on les trouve constituées par de fins filaments transversalement divisés en segments d'inégale longueur, très petits dans les vieilles cultures. On les colore aisément par les couleurs basiques. Ils prennent le Gram.

La maladie appelée *Pied de Madura* est constituée par un mycétome assez commun dans l'Inde, dans le Levant, dans l'Afrique du Nord et au Sénégal.

*
* *

H. — Teignes.

On donne le nom de *teignes* aux *mycoses de l'épiderme du cheveu et du poil.*

Le milieu de culture le plus favorable est la gélose neutre et sucrée de *Sabouraud,* dite milieu d'épreuve, parce qu'il permet la différenciation des espèces. Sur ce milieu, les espèces dégénèrent. On les conserve mieux sur les *milieux de Sabouraud* sans hydrate de carbone.

L'examen microscopique des squames et des poils s'opère suivant la technique indiquée.

*
* *

I. — Blastomycoses.

Les blastomycoses sont produites par des formes levures de champignons.

Le *muguet* (*Endomyces albicans*) est la blastomycose la plus commune. Les frottis de l'exsudat blanchâtre siégeant sur les muqueuses, colorés par le Gram, montrent des formes brunes et quelques filaments. La culture sur carotte donne des colonies blanches, crémeuses, caractéristiques.

La *Lymphangite épizootique des solipèdes* (*Cryptococcus farciminosus, de Rivolta*) est une affection des chevaux, mulets, ânes, qui est très répandue dans le bassin méditerranéen.

Ensemencer un demi-centimètre cube de pus sur gélose de Sabouraud et mettre les tubes à 34-35°. A cette température les colonies apparaissent au bout d'une dizaine de jours.

Dans le pus, les cryptocoques se colorent par le Giemsa. Ils prennent mal le Gram, mieux le Claudius.

CHAPITRE XL

MICROBES ANAÉROBIES DES PLAIES ET DES PUTRÉFACTIONS

A. — **Vibrion septique et Bacillus Chauvœi.** (*Charbon symptomatique*).

Examen à l'état frais. — Bâtonnets mobiles (mouvements onduleux) ciliés, souvent réunis en chaînettes, spores centrales ou subterminales déformant le corps du microbe (clostridium) aspect de massue, de barillet ou de fuseau. Les spores ne se produisent pas dans l'organisme vivant.

a) Coloration. — Se colorent par toutes les couleurs d'aniline. Prennent le Gram, mais se décolorent facilement si on prolonge trop l'action de l'alcool. Spores et cils colorables par les procédés décrits au chapitre VII.

b) Culture. — Anaéroties. — Poussent entrent 30 et 40°. Optimum 37°. Le bouillon Martin frais est le milieu de choix. En 15 heures, trouble abondant et dégagement de gaz, puis des flocons apparaissent dans le milieu, se déposent, le dégagement gazeux s'arrête et, en 48 heures, le liquide est clarifié. Odeur butyrique.

Gélatine. — Liquéfiée lentement et souvent disloquée par les gaz. Colonies arrondies, laiteuses. Aspect arborescent, en chenille, le long de la strie.

Gélose. — Colonies arrondies, lenticulaires à bords arborescents, dégagement gazeux dans la gélose de Veillon.

Sérum coagulé. — Non liquéfié.

Lait. — Lentement coagulé (5 à 20 jours), puis le caillot se rétracte, se fragmente, et le liquide se clarifie.

Font fermenter le glucose, le galactose, le lévulose, le lactose et le maltose. Produisent une toxine (*Roux et Cham-*

berland) et une hémolysine (*M. Nicolle*). Pathogènes pour le bœuf, le mouton et le cobaye. Le lapin est moins sensible. Les deux microbes ont des caractères et des propriétés presque identiques. Ils sont généralement considérés comme appartenant à la même espèce.

*
* *

B. — Bacillus perfringens.

Examen à l'état frais. — Bacille trapu, droit, à bouts carrés, isolé ou en diplobacilles, non cilié, immobile. Spores ovalaires médianes, terminales ou libres, rares dans les milieux artificiels.

a) Coloration. — Se colore par toutes les couleurs d'aniline. Prend le Gram.

b) Culture. — pH = 6,0-7,6. Anaérobie strict. Culture rapide en bouillon ordinaire, plus abondante en bouillon glucosé à 2 p. 100; dégagement gazeux, odeur butyrique ; finalement les microbes se déposent et le liquide s'éclaircit.

Gélatine glucosée. — Lentement liquéfiée.

Gélose glucosée profonde. — Colonies lenticulaires avec petites protubérances. — Dégagement gazeux.

Sérum coagulé. — Rarement attaqué.

Ovalbumine coagulée. — Non attaquée, mais devient parfois translucide.

Lait. — Coagulé en 24 heures, puis caillot rétracté, spongieux par accumulation de gaz. Le lait tournesolé rougit.

Attaque le glucose, lévulose, galactose, maltose, lactose. Certains échantillons font fermenter l'inuline et la glycérine ou l'une de ces deux substances seulement.

Pathogène pour les animaux et l'homme. Fréquemment rencontré dans les plaies souillées. Produit des phlegmons gazeux, de la gangrène gazeuse et parfois de la septicémie. Le pigeon, la souris et le cobaye sont très sensibles, le lapin plus résistant.

Produit une toxine et une hémolysine.

*
* *

C. — **Bacillus œdematiens.**

Examen à l'état frais. — Bacille long, droit, incurvé ou sinueux, à bouts arrondis, cilié, mobile dans l'organisme et les cultures jeunes. Spores ovalaires subterminales ou libres, abondantes.

a) Coloration. — Prend le Gram.

b) Cultures. — Anaérobie strict. Trouble le bouillon glucosé, puis les microbes s'agglutinent et se déposent. Dégagement gazeux. Odeur *sui generis.*

Gélatine. — Non liquéfiée, sauf lorsqu'elle est fortement sucrée (2 p. 100.)

Gélose profonde. — Colonies arborescentes, à centre opaque s'éclaircissant en 2-3 jours.

Sérum et ovalbumine coagulés. — Non attaqués.

Lait. — Lentement coagulé (5 à 30 jours), puis le caillot se désagrège.

Attaque plus fortement galactose, glucose, maltose et dulcite que lévulose et saccharose.

Très pathogène pour les animaux de laboratoire. Produit chez le cobaye, par inoculation sous-cutanée, un œdème gélatineux blanc ou rose, peu dépressible. Mort en 6-18 heures.

Produit une toxine très active et une hémolysine.

*
* *

D. — **Bacillus histolyticus.**

Cilié, mobile, sporulé.

a) Coloration. — Prend le Gram.

b) Cultures. — Anaérobie strict. Trouble uniformément le bouillon glucosé, puis se dépose. Pas de dégagement gazeux.

Liquéfie rapidement la gélatine. Digère le sérum coagulé et la viande. Coagule le lait, puis digère le caillot.

Pathogène pour tous les animaux de laboratoire : œdème, digestion des tissus, dénudation des os.

Produit une toxine qui provoque les mêmes désordres que le microbe.

*
* *

E. — **Bacillus sporogenes.**

Cilié. Mobile. Sporulé. Ressemble au vibrion septique.

a) Coloration. — Prend le Gram.

b) Cultures. — Anaérobie strict. Trouble le bouillon glucosé, dégagement gazeux et odeur putride.

Liquéfie rapidement gélatine, sérum et ovalbumine coagulés. Coagule le lait en grumeaux qu'il digère ensuite. Digère la viande. Attaque glucose, lévulose, maltose, galactose, mannite.

Certaines variétés sont pathogènes pour le cobaye (gangrène gazeuse putride) et pour l'homme lorsqu'elles sont associées à d'autres microbes. Produit une toxine peu active.

*
* *

F. — **Bacillus fallax.**

Cils nombreux et longs. Mobile, peu sporulé, encapsulé dans les cultures jeunes et les sérosités pathologiques.

a) Coloration. — Prend le Gram.

b) Cultures. — Anaérobie. Trouble le bouillon Martin sucré, avec dégagement gazeux et odeur aigrelette. Non protéolytique mais fortement saccharolytique. Pathogène pour le cobaye. Toxine peu active.

*
* *

G. — **Bacillus aerofœtidus.**

Mobile. Prend le Gram. Non sporulé. Trouble le bouillon Martin. Odeur.

Liquéfie rapidement la gélatine. Attaque l'ovalbumine coagulée et la rend transparente. Coagule le lait et digère le caillot. Digère le sérum coagulé. Peu pathogène pour le cobaye.

*
* *

H. — Bacille tétanique.

Examen à l'état frais. Bâtonnet grêle, non sporulé dans le pus. Spore terminale réfringente dans les milieux de culture (forme en épingle). Légèrement mobile en l'absence d'oxygène et seulement avant la sporulation. Nombreux cils péritriches (30 à 100) en culture jeune non sporulée.

a) Coloration. — Toutes les couleurs basiques d'aniline. Spores colorables par la méthode de Moeller comme celles du charbon. Prend le Gram.

b) Culture. — pH limites = 5,5-8,3 ; optimum = 7,0-7,6. Anaérobie. Supporte la présence de faibles quantités d'oxygène. Culture entre 15 et 42°. Optimum 37°. Bouillon frais troublé en 24 heures, puis éclairci par dépôt des spores. Odeur caractéristique de corne brûlée.

Gélose. — Culture en arbre de pin par piqûre. Dégagement de fines bulles gazeuses (CO^2, CH^4).

Gélatine. — Colonies radiées. Dégagement de petites bulles gazeuses. Liquéfaction lente.

Lait non coagulé.

Pomme de terre — Culture maigre, filaments fins, sans spores.

Pulpe de cerveau. — Excellent milieu (*von Hibler*), noircit par formation de sulfure de fer.

Spores très résistantes à la chaleur (tuées en 4 heures à 90°, en 2 à 3 minutes à 100°) et aux antiseptiques. Abondantes dans l'intestin des herbivores et la terre des jardins.

Tous les animaux de laboratoire sont sensibles à l'infection tétanique, la souris, le rat et le cobaye, en particulier, le lapin et le chien résistent davantage. Les cultures jeunes ne sont pas virulentes. Dès que la toxine est formée, leur inoculation donne le tétanos. Les spores lavées et chauffées

à 80° sont inoffensives ; mais lorsqu'elles sont protégées contre la phagocytose par un caillot sanguin, des corps étrangers ou des microbes associés, ou quand elles sont injectées avec une dilution d'acide lactique ou de sulfate de quinine, elles deviennent tétanigènes.

Le bacille tétanique reste localisé au point d'inoculation où il sécrète une toxine d'une extrême activité. Le milieu le plus favorable à la préparation de la toxine tétanique est le bouillon Martin frais, faiblement alcalin, additionné de 1 p. 100 de peptone et de 0,5 p. 100 de NaCl. Culture à 37°. Le maximum d'activité est observé vers le 10e jour ; la toxicité diminue ensuite, surtout au contact de l'air. Les cultures décantées, non filtrées, sont plus actives. On peut obtenir des filtrats hypertoxiques en ensemençant le bacille tétanique dans un filtrat provenant d'une culture de 20 jours et en répétant la même opération une ou deux fois. Une toxine initiale tuant la souris au 1/1.000 de centimètre cube peut ainsi devenir mortelle pour le même animal à 1/100.000 de centimètre cube.

La toxine tétanique est facilement modifiée ou détruite par la lumière et les agents oxydants, par la bile dont 1 centimètre cube neutralise 200 doses mortelles pour le cobaye (*Vincent*) ; le trichlorure d'iode, la solution de Lugol, le formol (*Ramon*). On la conserve en solution glycérinée au froid ou sous huile de paraffine. Elle est précipitable par le sulfate d'ammoniaque à saturation. Le précipité dialysé et séché à 22° est stable. Injecté aux animaux sensibles, il provoque l'apparition d'un tétanos typique.

*
* *

I. — **Bacillus botulinus**.

Bacille rectiligne, à bouts arrondis. Sporulé. Légèrement mobile. Prend le Gram. Anaérobie strict. Température optimum 22°. Trouble le bouillon glucosé avec dégagement gazeux. Odeur butyrique. Colonies transparentes, arrondies, jaune brun sur gélose glucosée. Gélatine, lentement liquéfiée.

Peu pathogène. Rencontré dans les aliments altérés ;

sécrète une toxine très active dont l'injection reproduit les symptômes de la maladie naturelle (botulisme).

*
* *

J. — **Bacillus fusiformis.**

Examen à l'état frais. Bacille long, rectiligne ou incurvé, parfois sinueux, extrémités effilées et partie médiane renflée. Non cilié. Immobile.

Coloration. — Toutes les couleurs basiques d'aniline. Ne prend pas le Gram.

Culture. — Anaérobie. Culture difficile, vit en symbiose avec divers microbes, cocci, spirilles. On peut obtenir des colonies pures, repiquables dans la gélose sucrée de Veillon.

Pathogène (pourriture d'hôpital, angine de Vincent) est généralement associé à un fin spirille.

*
* *

K. — **Bacillus bifidus.**

Bacille polymorphe, même dans les cultures jeunes ; filamenteux, vésiculeux, bifurqué dans les vieilles cultures. Immobile. Prend le Gram. Anaérobie.

Peu pathogène. Très abondant dans l'intestin des nourrissons élevés au sein.

CHAPITRE XLI

VIRUS INVISIBLES ET VIRUS FILTRANTS (ULTRAVIRUS)

Les *virus « filtrants »* étaient, jusqu'à ces dernières années, considérés comme appartenant tous au groupe des *microbes invisibles ou ultramicroscopiques*. Nous savons actuellement que certains microbes filtrants, tel celui de la *fièvre jaune*, de la *péripneumonie des bovidés* et de la *rage*, peuvent être décelés au microscope, et que certains bacilles, comme celui de la *tuberculose*, passent à travers les bougies Chamberland. On ne peut donc plus considérer que le caractère de filtrabilité implique celui d'invisibilité. En attendant que la place, dans la classification, des microbes de la péripneumonie et de la rage soit établie, nous maintiendrons provisoirement ces deux maladies dans ce groupe. Celui-ci comprend avec elles *l'agalaxie contagieuse* de la brebis et de la chèvre, *la diphtérie aviaire, le typhus exanthématique, la fièvre tachetée des Montagnes Rocheuses, la fièvre fluviale du Japon, la scarlatine, la rougeole, la poliomyélite épidémique, l'encéphalite épidémique, l'herpès, la grippe, la fièvre de trois jours ou fièvre à pappatacis, la dengue, le trachome, la vaccine, la clavelée, la fièvre aphteuse, le hog-choléra, la peste bovine, la peste porcine, la peste des oiseaux, la maladie des chiens, l'anémie pernicieuse du cheval* et *la horse sickness*.

Technique de la filtration des virus. — Pour opérer la filtration d'un liquide pathologique virulent, il faut le diluer dans dix à vingt fois son volume d'eau physiologique pour éviter le colmatage de la bougie par l'albumine pure.

La filtration doit être effectuée sous faible pression et aussi rapidement que possible. Si elle durait trop longtemps, la culture des microbes se ferait à travers les pores de la bougie et les résultats n'auraient plus aucune signification.

Pour les autres détails sur la filtration, et en particulier sur les bougies filtrantes, voir *chapitre II*.

voir *chapitre II*.

*
* *

A. — RAGE

I. — Extraction de la moelle pour le diagnostic de la rage chez le chien.

Placer le cadavre en position sterno-abdominale.

Fléchir très fortement la tête vers le sternum pour mettre bien en relief la base du crâne.

En arrière de la protubérance occipitale externe et à 2 ou 5 centimètres de cette éminence, suivant la taille de l'animal, inciser profondément et largement la peau et les muscles pour arriver au ligament capsulaire de l'articulation occipito-atloïdienne.

Sectionner ce ligament qui recouvre la moelle placée dans le canal rachidien.

Prélever, de cette moelle mise à nu, un fragment le plus important possible, et, pour cela, sectionner cet organe très en avant et très en arrière dans l'intérieur du canal rachidien.

Introduire aussitôt ce fragment dans un flacon contenant de la glycérine à 30° B[e] stérile.

II. — Méthode d'Oshida pour l'extraction des moelles rabiques de lapin.

Le lapin est étendu et fixé par sa face abdominale sur un plateau à autopsie.

Avec les ciseaux courbes, on coupe les poils de la région dorso-lombaire sur 5 ou 6 centimètres de largeur. On flambe ensuite toute cette région avec un bec Bunsen.

On coupe ensuite transversalement, au moyen d'un bistouri stérile, la peau du cou et les muscles sous-jacents au niveau de la 3[e] ou 4[e] vertèbre cervicale ; puis la peau et les muscles de la région lombaire au niveau de la 3[e] ou 4[e] vertèbre lombaire.

Avec une forte paire de ciseaux stériles on sectionne d'un seul coup la colonne vertébrale aux mêmes endroits (vertèbres cervicales et vertèbres lombaires). On reprend le bistouri



Fig. 11. — Extraction de la moelle rabique de lapin suivant la méthode d'Oshida.

pour dégager le cou et attirer la tête en avant afin de faire de la place pour l'enlèvement des moelles.

On reprend ensuite le bec Bunsen et on flambe rapidement les deux sections de la colonne vertébrale.

On a préparé et stérilisé d'avance des mandrins de 0 m. 40 de longueur et 2 millimètres de diamètre, terminés à une extrémité par une section nette, et portant à l'autre une courbure en anse formant poignée.

L'extrémité droite porte un petit tampon d'ouate stérile, enroulé très serré et dont l'épaisseur est calculée pour pénétrer dans le canal rachidien.

Pour extraire la moelle, il suffit d'introduire ce mandrin dans le canal médullaire, bien horizontalement d'arrière en avant, par les lombes. La moelle est refoulée (sans ses membranes) et sort en tortillon par l'ouverture cervicale sous laquelle on a pris soin d'étendre un carré de papier buvard stérilisé pour la recevoir.

Il est recommandable de l'extraire en deux temps. Lorsque la première moitié de la moelle est étalée sur le carré de papier, on la coupe avec une pince et une paire de ciseaux

flambés, et après avoir fixé un fil en boucle à l'une de ses extrémités, on introduit chaque tronçon dans un flacon à large ouverture garni de quelques fragments de potasse anhydre. (*Fig. 11*).

Les moelles rabiques atténuées par dessiccation lente dans de tels flacons, pendant 1 à 6 jours, servent à préparer les émulsions vaccinales.

Il est commode de les conserver par immersion dans des pots-bans à moitié remplis de glycérine pure à 30° Baumé stérile (Méthode de Calmette). On peut ainsi disposer de réserves de moelles atténuées, de 1 à 6 jours, et immergées en glycérine, liquide dans lequel la virulence de ces moelles reste fixe pendant environ deux semaines. On en prélève chaque jour, suivant les besoins, des fragments qui, après avoir été essorés sur papier buvard stérile, sont broyés, émulsionnés dans l'eau physiologique stérile, à raison de 2 millimètres de moelle par centimètre cube, et utilisés pour la vaccination des sujets mordus.

III. — Diagnostic par la recherche des corps de Negri.

On peut l'effectuer par l'examen à l'état frais de la corne d'Ammon [1]. Pour isoler celle-ci, après avoir dégagé les hémisphères cérébraux de la boîte cranienne, on coupe transversalement l'un d'eux jusqu'au corps calleux qu'on soulève avec le trigone et on pénètre dans la portion temporale du ventricule latéral. Le plancher du ventricule latéral est alors à découvert et la corne d'Ammon apparaît avec sa forme caractéristique. On y fait, avec un bistouri fin, une coupe mince perpendiculaire à sa surface et, avec une aiguille, on recueille une parcelle de substance grise de la circonvolution. C'est cette parcelle qu'on dissocie sur un porte-objet, dans une goutte de solution très diluée d'acide acétique (1 : 10.000) et qu'on examine à l'état frais ; ou bien on fait des frottis qu'on sèche immédiatement et qu'on fixe avant de les colorer par l'une des méthodes suivantes :

(1) Si l'on ne dispose pas de la corne d'Ammon, les recherches doivent porter sur des fragments d'écorce cérébrale et du cervelet. L'étude de la moelle allongée et des ganglions spinaux (ganglions cervicaux, ganglion de Gasser) fournit des résultats moins constants.

a) ***Méthode de Mann.*** — 1° ***Coupes.*** — Fixer le tissu de la corne d'Ammon dans le liquide de Zenker et enrober dans la paraffine. On peut fixer plus rapidement les minces fragments de tissu par immersion dans 15 centimètres cubes d'acétone à la température de 37° pendant 30 à 40 minutes. On les plonge ensuite dans une paraffine fondue à 55° pendant 1 heure à 1 h. 15, puis les pièces sont montées et coupées.

Colorer dans la solution suivante, 12 à 24 heures (30 minutes suffisent pour les frottis) :

Sol. aq. à 1 p. 100 de bleu de Méthylène. .	35 cc.
Sol. aq. à 1 p. 100 d'éosine.	35 cc.
Eau distillée.	100 cc.

Laver rapidement à l'eau. Plonger quelques minutes dans l'alcool absolu. Immerger environ 10 minutes, jusqu'à coloration rose dans :

Alcool absolu.	30 cc.
Sol. à 1 p. 100 de soude caustique dans l'alcool absolu. . .	X gtt.

Laver rapidement à l'alcool absolu. Plonger 1 à 2 minutes dans l'eau jusqu'à ce que les coupes deviennent bleuâtres. Plonger 1 à 2 minutes dans l'eau additionnée de 2 ou 3 gouttes d'acide acétique p. 100. Replonger dans l'alcool absolu. Xylol. Baume.

Les *corpuscules de Negri* sont colorés en rouge violet foncé, les nucléoles des cellules nerveuses en rouge, les noyaux et le tissu cellulaire en bleu foncé, les globules rouges en rose pâle.

2° *Frottis.* — On prépare plus commodément de simples frottis par écrasement d'une parcelle de substance grise de la corne d'Ammon entre deux porte-objets. Après dessiccation rapide à l'étuve, on plonge les lames encore humides dans l'alcool méthylique pur, puis dans un mélange à parties égales d'alcool absolu et d'éther. On a préparé d'avance des colorants ci-après (Méthode de Lentz) :

A.	Eosine extra B de Hœchst.	0 gr. 5
	Alcool à 60°.	100 cc.
B.	Bleu de Méthylène B de Hœchst. sol. al. sat. .	30 cc.
	Sol. de potasse de 0 gr. 01 p. 100.	100 cc.
C.	Alcool absolu.	30 cc.
	Sol de soude caustique à 1 p. 100 dans alcool absolu.	V gtt.
D.	Alcool absolu.	30 cc.
	Sol. acide acétique à 50 p. 100.	1 gtt.

On verse, sur les lames porte-objets, quelques gouttes de la solution A. On laisse en contact 1 minute. Laver à l'eau. Colorer ensuite par B, 1 minute ; laver à l'eau. Essorer avec papier buvard. Différencier par l'alcool sodique C, jusqu'à ce que la préparation apparaisse faiblement teintée en rose, puis par l'alcool acétique D jusqu'à ce que les noyaux bleus deviennent apparents.

Laver rapidement à l'alcool absolu et monter, ou examiner immédiatement dans une goutte d'huile à immersion.

On peut encore employer la technique suivante qui rend les « corps de Négri » plus apparents dans leurs détails de structure :

Colorer dans A pendant 1 minute. Laver à l'eau. Colorer dans B pendant 1 minute. Laver à l'eau. Traiter par la solution de Gram-Lugol 1 minute. Laver à l'eau. Différencier par l'alcool méthylique jusqu'à ce que la préparation apparaisse rose. Laver à l'eau Recolorer par la solution B, 30 secondes. Laver à l'eau. Essorer au papier buvard. Passer successivement dans les alcools alcalin et acide C et D, puis, rapidement, dans l'alcool absolu et monter.

b) ***Méthode de Negri***. — Traiter pendant 10 minutes les coupes ou les frottis préalablement fixés dans l'alcool absolu par :

Eosine B (Grubler)	1 gr.
Iode en paillettes	0 gr. 1
Iod. de potassium	2 gr. 2
Eau distillée	100 cc.

(Dissoudre d'abord l'iode et l'iodure de potassium dans quelques centimètres cubes d'eau et diluer ensuite dans 50 centimètres cubes. D'autre part, dissoudre l'éosine dans 50 centimètres cubes d eau distillée. Mélanger, puis filtrer. Conserver en flacon bouché à l'émeri.)

Après coloration, laver à l'eau distillée. Traiter 5 minutes par une solution aqueuse à 0 gr. 1 p. 100 de bleu de méthyle. Laver à l'eau distillée. Différencier dans l'alcool à 95°. Laver à l'alcool absolu. Sécher. Eclaircir et monter au baume. Les « corps de Negri » apparaissent brillants, rouge violacé, sur le bleu du protoplasma et des noyaux. Les hématies sont roses. Les corpuscules basophiles des vacuoles des « corps de Negri » sont bleus.

c) ***Méthode de Manouélian.*** — Enlever, à l'aide de ciseaux très fins, de très minces tranches de corne d'Ammon et les immerger dans :

Acétone.	50 cc.
Teinture d'iode.	VI gtt.

Après 30 minutes, renouveler l'acétone sans iode, puis au bout d'un quart d'heure, inclure dans la paraffine. En une demi-heure, l'inclusion peut être achevée et les coupes sont colorées, par la méthode de Mann, de 15 minutes à deux heures, à la température de 38 à 40°.

On peut fixer les frottis de corne d'Ammon directement sur lame par l'acétone iodé pendant quelques secondes. On lave à l'eau courante pendant une minute, on colore pendant un quart d'heure à chaud par le Mann et on différencie par l'alcool sodique, l'alcool absolu, etc.

d) ***Méthode de Nissl.*** — (Pour l'étude des éléments cellulaires du tissu nerveux.)

Colorer pendant un temps variable, de 1 à 2 heures, dans le bleu polychrome de Unna. Différencier par le mélange suivant (dit de Gotha) :

Alcool absolu.	16 vol.
Xylol.	5 vol.
Essence de Cajeput.	4 vol.
Créosote de hêtre.	5 vol.

Déshydrater rapidement à l'alcool absolu. Xylol. Baume. Les granulations des cellules nerveuses sont colorées en bleu, le tissu conjonctif en vert.

NOTA. — *P. Remlinger* a montré que le virus rabique est filtrable et diffusible (par exemple dans la glycérine pure et dans le liquide de Locke). Il n'est pas influencé par la centrifugation.

e) ***Méthode de J. Manouélian et J. Viala*** (pour la recherche de *l'Encephalitozoon rabiei,* parasite de la rage ?),

Pour la fixation, utiliser le *sublimé alcoolo-acétique de Gilson* modifié ou le *sublimé de Dominici.*

Le premier mélange est composé de parties égales d'acétone pure, chloroforme et acide acétique cristallisable.

On ajoute du bichlorure de mercure en poudre, en excès. Le mélange doit être préparé d'avance. Au moment de s'en

servir, on ajoute goutte à goutte une solution alcoolique concentrée d'iode en agitant le liquide avec une baguette de verre jusqu'à ce que le fixateur prenne une teinte acajou foncé.

Le liquide de Dominici doit être préparé extemporanément. On décante une solution aqueuse saturée de sublimé et l'on verse goutte à goutte, en agitant, de la teinture d'iode jusqu'à teinte orangée.

A 100 volumes de cette solution, on ajoute 12 volumes de formol à 40 p. 100 et 5 volumes d'acide acétique. Il faut avoir soin de maintenir la teinte orangée du mélange en ajoutant encore au besoin quelques gouttes de teinture d'iode.

Les pièces séjournent de deux, quatre, six à douze et vingt-quatre heures dans le fixateur, puis on les transporte dans l'alcool ou l'acétone iodé, avant de procéder à l'inclusion.

Les auteurs recommandent la double inclusion : d'abord à la celloïdine puis à la paraffine. Lorsque l'inclusion à la celloïdine est achevée, il faut éviter de durcir complètement la masse collodionnée ainsi qu'on le fait dans la technique ordinaire. La pièce doit être entourée d'une couche légère de celloïdine assez épaisse, qu'on laisse sécher à l'air pendant quelques minutes. Au bout de ce temps, le bloc est mis dans le mélange suivant :

Alcool absolu.	500 cent. cubes
Chloroforme.	50 cc.

Ce liquide remplace l'alcool absolu dans l'inclusion à la paraffine. Après un séjour de quelques heures, variable suivant les dimensions de la pièce, on transporte celle-ci dans un solvant de la paraffine, toluène, par exemple.

Pour la *méthode de Mann*, voici comment les auteurs conseillent de procéder :

1° Colorer les coupes pendant quelques heures à 38-40° dans le mélange suivant, préalablement porté à la même température :

Sol. aq. de bleu de méthyle (ne pas confondre avec bleu de méthylène) à 1 p. 100. . . .	35 cc.
Sol. aq. d'éosine à 1 p. 100.	45 cc.
Eau distillée.	100 cc.

2° Laver rapidement et soigneusement à l'eau de fontaine ;
3° Déshydrater les coupes à l'alcool absolu ;
4° Faire agir la solution suivante :

Alcool absolu.	30 cc.
Solution de soude, caustique à 1 p. 100. .	X gtt.

Attendre jusqu'à ce que les coupes deviennent rouges, mais aussitôt que cette teinte est obtenue, arrêter la différenciation ;

5° Laver à l'alcool absolu afin d'enlever toute trace de soude caustique ;

6° Plonger dans l'eau ordinaire ; des traînées rougeâtres quittent les coupes qui deviennent bleuâtres ;

7° Plonger dans l'eau acidulée par l'acide acétique (2 gouttes d'acide dans 40 centimètres cubes d'eau). Immédiatement les coupes deviennent bleues. Attendre une minute.

Déshydrater les coupes par l'alcool absolu, éclaircir au xylol et monter au baume-acide. Ce baume-acide se prépare en dissolvant le baume de Canada dans du xylol préalablement saturé d'acide salicylique.

Pour les frottis, les fixer *humides* en plongeant les lames dans les fixateurs dont la composition a été indiquée plus haut. Les y laisser au moins un quart d'heure. Colorer et différencier comme pour les coupes.

*
* *

B. — TYPHUS EXANTHÉMATIQUE [1]

Le typhus exanthématique, à sa période de début, peut être confondu avec la grippe, la rougeole, la fièvre méditerranéenne, le paludisme, mais, surtout dans nos pays, avec la dothiénentérie accompagnée d'éruption purpurique.

En présence d'un cas suspect, faire une *ponction veineuse* pour :

a) Une hémoculture ;

b) Un examen microscopique ;

1. Technique mise au point par Legroux à l'Institut Pasteur.

c) Des séro-agglutinations ;

d) Une inoculation dans le péritoine de 2 cobayes ;

e) Examiner aussi, tous les deux jours, le liquide céphalo-rachidien après *ponction lombaire.*

a) L'hémoculture décèle les infections typhoïdique et mélitensique.

b) Si l'examen microscopique, à l'état frais, entre lame et lamelle, ne décèle pas le spirille d'Obermeier, ou après étalement et coloration, l'hématozoaire de Laveran, on devra dénombrer et diagnostiquer les leucocytes. D'après les indications de *Ch. Nicolle*, puis de *Jonesco Mihaesti*, l'hyperleucocytose oscille entre 13.000 et 20.000 leucocytes par millimètre cube. La polynucléose est abondante, le protoplasme des globules blanc et leur noyau sont altérés ; on compte 5 à 6 °/₀ d'éosinophiles ; vers la fin de la maladie, 10ᵉ à 15ᵉ jour, apparition des mononucléaires et disparition des éosinophiles.

c) Les séro-agglutinations se recherchent avec les bacilles typhique, paratyphique A et B pour éliminer le diagnostic de dothiénentérie.

La séro-agglutination, dans les cas suspects de typhus exanthématique, se pratique avec différentes bactéries isolées de l'intestin des typhiques. Plusieurs souches ont été proposées ; celle qui, aujourd'hui, est le plus couramment employée, est la culture de *B. proteus X 19*, de *Weil-Félix* ; des cultures de ce bacille ont été isolées en Europe centrale, méridionale, en Orient et chacune semble être plus agglutinable par les sérums des malades de sa région d'origine.

La séro-réaction de Weil-Félix *n'est pas spécifique*. Elle possède néanmoins une valeur indicative lorsqu'elle est bien observée :

Elle doit être recherchée à un taux élevé, à partir du 1/100. Le sérum de malades atteints de fièvre typhoïde peut agglutiner le *B. proteus X 19*, d'après Weil et Félix eux-mêmes, entre 1/25 et 1/40 dans 10 p. 100 des cas.

Au cours du T. E., les agglutinines pour le *B. proteus X 19* apparaissent entre le *4ᵉ et le 8ᵉ jour* ; elles atteignent leur

maximum vers le *11e jour*, puis diminuent très rapidement après le 20e ; leur présence, dans le sérum des convalescents, persiste jusqu'à la fin du 2e mois après la guérison.

Technique. — Observer les agglutinations *macroscopiques totales* à la température du laboratoire (10 à 15°) en notant les taux positifs pendant les deux premières heures, puis entre la 5e et 8e heure ; une agglutination totale s'opère rarement après ces délais. Faire la réaction dans de petits tubes de verre de 6 à 8 millimètres de diamètre. L'agglutination est obtenue en petits grumeaux qu'il y a intérêt à examiner à la loupe pour les taux limites.

Comme pour toute agglutination, la valeur de la réaction dépend :

1° De la *densité microbienne* de l'émulsion :

L'émulsion bactérienne à la densité voulue s'obtient en délayant, dans 5 centimètres cubes d'eau physiologique, une anse de platine (2 mm. de diamètre) d'une culture de 16 à 18 heures à 37°, sur gélose. La culture de *B. proteus X 19* datant de plusieurs jours est peu agglutinable, et une émulsion préparée trop à l'avance ne peut plus être agglutinée.

2° De la *dilution du sérum* dans l'émulsion :

Le taux d'agglutination positive variant suivant les périodes de la maladie, commencer les dilutions par 1/100 et rechercher le taux limite maximum entre le 1/500 et le 1/10.000 vers le 11e jour.

3° Du *temps* dans lequel la réaction s'opère :

L'agglutination rapide en 15 à 30 minutes à une dilution du sérum au 1/100 ou au 1/200 possède une grande valeur ; l'agglutination presque immédiate d'une dilution très faible, 1/5, 1/10 ne peut servir que d'indication dans la recherche ultérieure d'une réaction plus marquée.

4° De la *température* à laquelle l'agglutination se produit.

Le phénomène est accéléré à la température de l'étuve, 37° ; il doit être, dans ce cas, terminé en moins d'une heure.

d) 1° L'inoculation aux cobayes (2 cc. 5 de sang dans le péritoine de chaque animal) du sang d'un malade atteint de typhus exanthématique au début de la période fébrile, donne une maladie expérimentale ; la température de l'animal, prise matin et soir, marque une élévation de 6 à

10 jours de durée : 7 à 10 jours après l'inoculation (température normale 39°, 39°5) ; épreuve vraiment spécifique, mais dont la réponse ne peut être donnée avant 12 jours et qui demande parfois le contrôle de passages en série aux animaux.

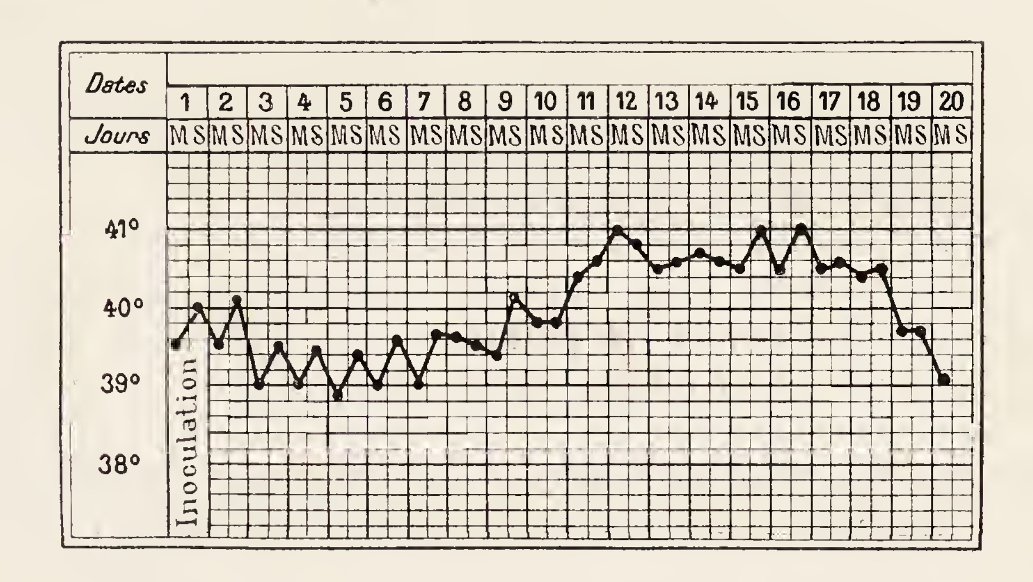


Fig. 12. — Courbe de cobaye infecté (Ch. Nicolle).

2° S'il est possible de prélever des poux ayant piqué le malade pendant les premiers jours de sa maladie, on peut conserver les parasites 8 à 10 jours (les nourrir sur des souris nouveau-nées ou mieux un singe), et, à ce moment, inoculer le broyage de ces poux sous la peau d'un cobaye ou d'un singe. Le résultat positif se traduit, comme dans l'inoculation intrapéritonéale, par une élévation thermique du même type. Pour être certain de la température des animaux, enfoncer le thermomètre de 8 centimètres environ.

E. — Ponction lombaire : d'après *Devaux*, *Paulian* et *Tupa*, la réaction cellulaire du liquide céphalo-rachidien serait précoce ; ces auteurs recommandent de pratiquer la ponction tous les 2 jours, afin de suivre le pourcentage et les variations qualitatives des leucocytes.

Prendre 5 centimètres cubes de liquide, centrifuger 5 minutes à 7.000 tours, faire un étalement uniforme sur lame du culot de centrifugation, colorer ; oculaire comp. 6, objectif à imm. 1/12, on voit :

Dans les formes légères de typhus exanthématique, 5 à 6 leucocytes par champ ;

Dans les formes moyennes de typhus exanthématique, 15 à 20 leucocytes par champ ;

Dans les formes graves de typhus exanthématique, 60 à 80 leucocytes par champ.

Au début de la période fébrile, prédominance des leucocytes polynucléaires à protoplasme vacuolaire et karyorhexie ; après quelques jours, apparition des mononucléaires dont la moitié est formée de cellules de Türk avec dégénérescence karyorhexique, puis 2 à 3 jours avant la chute de la température, apparition des lymphocytes.

Dans les cas de typhus exanthématique à éruptions purpuriques avec forte injection des conjonctives, ou dans les formes très délirantes, la ponction lombaire donne issue à un liquide coloré en jaune. Cette xanthochromie peut être légère et, pour bien la voir, il est nécessaire d'examiner le liquide dès qu'il a été retiré, et surtout dans un tube étroit, en regardant en hauteur l'axe du cylindre ; si la xanthochromie est intense, la couleur se voit, même sous faible épaisseur.

*
* *

C. — PÉRIPNEUMONIE DES BOVIDÉS

Culture. — *Nocard*, *Roux*, *Borrel* et *Salimbeni* ont réussi, en 1898, à cultiver le microbe de la péripneumonie en sacs de collodion dans le péritoine du lapin.

In vitro, *Dujardin-Beaumetz* a obtenu des cultures à 38° dans du bouillon Martin additionné de 6 à 8 p. 100 de sérum de bœuf, sous la forme d'un louche à peine perceptible. En gélosant ce milieu liquide, on observe un très grand nombre de petites colonies dont l'inoculation donne des résultats positifs.

J. Bordet a obtenu, sur la gélose sanglante à l'extrait de pomme de terre (voir *Bacille de la coqueluche*), un développement du microbe de la péripneumonie. Après 48 heures de séjour à l'étuve, il ne se forme pas de culture apparente, mais, en raclant la surface et en faisant des préparations du produit de raclage, on met en évidence, par le Giemsa, un microbe ayant l'apparence d'un filament ondulé, ou en S, avec des spires.

Borrel, Dujardin-Beaumetz, Jeantet et *Jouan*, en opérant sur le culot de centrifugation des cultures, lavé dans l'eau physiologique, ont, après mordançage et surcoloration par la méthode de Löffler, mis en évidence un polymorphisme tout à fait remarquable de ce germe.

*
* *

D. — AGALAXIE CONTAGIEUSE DE LA BREBIS ET DE LA CHÈVRE

Celli et *de Blasi* ont établi que le virus traversait les filtres.

Bridré et *Donatien* l'ont cultivé sur bouillon-sérum et ont pu reproduire la maladie par inoculation des cultures après plusieurs passages.

*
* *

E. — POLIOMYÉLITE ÉPIDÉMIQUE

La poliomyélite a pu être inoculée expérimentalement au chimpanzé, aux singes inférieurs et même au lapin, par injection de moelle virulente.

Si on injecte dans le cerveau d'un singe un filtrat sur bougie Berkefeld ou Chamberland d'une émulsion de moelle virulente, on lui communique la poliomyélite.

Flexner et *Noguchi* pensent avoir cultivé le virus de la poliomyélite dans le milieu qui leur a servi pour le tréponème de la syphilis.

*
* *

F. — ENCÉPHALITE ÉPIDÉMIQUE

Comme pour la poliomyélite, le virus semble siéger uniquement dans les centres nerveux. Ce virus est filtrant et invisible, alors que l'encéphalite spontanée épizootique du lapin paraît due à un parasite : l'*Encephalitozoon cuniculi* (*Levaditi*).

*
* *

G. — VACCINE.

Les travaux de *Rouget*, *Remlinger*, *Carini* et *Negri* ont montré que le virus de la vaccine est un virus filtrant.

L'un de nous, avec *C. Guérin*, a montré qu'il est possible, en utilisant le lapin, de contrôler avec précision la virulence des vaccins de diverses origines et d'âges différents.

Le lapin étant moins réceptif que la génisse et l'enfant, seuls les vaccins très virulents donnent chez lui de belles éruptions.

La technique de *Calmette* et *Guérin* consiste à badigeonner avec la pulpe vaccinale la peau fraîchement rasée, sans faire d'autres lésions épidermiques que celles, très superficielles, que produit le feu du rasoir. Après 48 heures, on observe une congestion intense du derme dont la coloration rouge vif tranche sur les parties voisines restées blanches. Cette réaction locale est surtout apparente chez les animaux de couleur claire ou albinos. Le troisième jour, l'éruption est à maturité complète. La plupart des pustules s'ombiliquent nettement, surtout sur les bords des plaques rouges. D'autres commencent à se couvrir de croûtes jaunâtres. Les jours suivants, la dessiccation s'achève. Les croûtes tombent du onzième au douzième jour.

La pulpe vaccinale, recueillie le quatrième ou le cinquième jour avec une curette à bord tranchant, est assez abondante et très active. On peut l'utiliser soit pour vacciner les enfants, soit pour reporter sur des génisses, soit pour inoculer de nouveaux lapins.

Préparation du vaccin chez la génisse. Prendre de jeunes génisses reconnues non tuberculeuses par épreuve à la tuberculine. On rase les poils des deux côtés de la poitrine et l'abdomen. On lave bien la peau ainsi rasée à l'eau tiède et on la sèche avec des serviettes stérilisées. Faire de grandes scarifications, espacées d'environ 10 à 12 millimètres, en évitant de faire saigner, puis, au moyen d'une spatule enduite de pulpe vaccinale diluée dans la glycérine, on ensemence les plaies scarifiées.

Toutes les régions inoculées sont recouvertes d'un ta-

blier de toile stérile, attaché sur le dos par des cordons. La récolte se fait vers le 5e ou 6e jour. On gratte les pustules avec une curette spéciale, en évitant les hémorragies. La pulpe est recueillie dans des pots-bans stériles, puis additionnée de glycérine dans la proportion de 2 de glycérine pour 1 de pulpe. Elle peut être aussi conservée au frigorigène (de — 7 à — 10°) pendant plusieurs mois. A ce moment on la broie dans l'appareil de Chalybeus et on la répartit en ampoules.

*
* *

H. — TECHNIQUE DE L'ISOLEMENT DES « BACTÉRIOPHAGES »

(d'après *d'Hérelle*).

Un appareil à filtration sur bougie Chamberland L_2 ou L_3 est indispensable pour les liquides non stériles. Si le matériel dans lequel on recherche le bactériophage est limpide, on le filtre sur une bougie. S'il présente un trouble homogène abondant, on le clarifie, au préalable, de la manière suivante. Dans un verre d'eau ordinaire, on ajoute une forte pincée de terre d'infusoires. On agite et on verse la suspension d'un seul coup sur un entonnoir garni d'un filtre plissé. A mesure que le liquide s'écoule, le papier se recouvre d'une mince couche de terre d'infusoires, sur laquelle on passe ensuite la suspension à essayer. Le liquide clair ainsi obtenu est finalement filtré sur bougie.

S'il s'agit d'un liquide tenant en suspension des particules organiques, ou de matières plus ou moins compactes (déjections, fumier, débris d'organes), on les désagrège, au préalable, en les émulsionnant grossièrement dans 10 à 20 parties de bouillon qu'on abandonne à l'étuve pendant 12 à 18 heures. On filtre ensuite successivement sur papier garni de terre d'infusoires, comme précédemment, et sur bougie.

Pour rechercher le bactériophage contre le bacille de Shiga par exemple, on ensemence quatre tubes de bouillon Martin avec une culture de 24 heures sur gélose. On ajoute dans le premier tube une goutte de filtrat, dix dans le second,

2 centimètres cubes dans le troisième, puis on les porte à l'étuve à 37° ; le quatrième sert de témoin. Suivant l'activité du bactériophage, un ou plusieurs tubes restent limpides après 12-18 heures. Cependant il convient de rechercher l'agent lytique, même lorsque tous les tubes de culture sont troubles. On décèlera sa présence en étalant une anse de chacune des cultures en bouillon sur tubes de gélose qu'on porte ensuite à l'étuve. Si le bacille dysentérique se développe alors normalement, la recherche du bactériophage peut être considérée comme définitivement négative. Quand il existe, la couche bactérienne présente un aspect varié : aspect déchiqueté, à bord corrodés, colonies isolées ou plages nues. S'il est très abondant, la gélose reste indemne de toute culture apparente.

Lorsqu'on se propose de vérifier l'activité d'un bactériophage à l'égard de plusieurs germes, on fait autant de séries de quatre tubes de bouillon qu'on ensemence, et on additionne de filtrat comme précédemment.

Numération des ultramicrobes bactériophages. — Chaque plage nue, qui apparaît dans une culture sur gélose additionnée de filtrat, correspond à un point où, pendant l'étalement, s'est déposé un élément bactériophage actif. Pour démontrer ces éléments, on prépare, une fois pour toutes, des tubes étalons contenant 100, 200, 300 et 400 millions de bacilles de Shiga par centimètre cube ; on ajoute une goutte de formol dans chaque tube qu'on scelle ensuite au chalumeau. L'émulsion destinée à la lyse doit être préparée, de préférence, avec des bacilles provenant d'une culture de 24 heures sur gélose ; elle est facilement obtenue en versant dans le tube 1 ou 2 centimètres cubes de bouillon dont on laisse s'imbiber la couche microbienne en inclinant le tube pendant quelques minutes. Agiter ensuite et prélever avec une pipette une petite quantité de cette émulsion concentrée qu'on versera goutte à goutte dans un tube de bouillon jusqu'à ce que l'opacité devienne intermédiaire entre celle des tubes étalons contenant 200 et 300 millions de bactéries par centimètre cube. Soit un tube contenant 10 centimètres cubes de cette émulsion de bacilles de Shiga. On l'additionne de 1/50.000 d'une culture de bactériophage âgée de 10 jours, c'est-à-dire d'une émulsion de

Shiga lysée depuis 10 jours. On agite pour bien répartir la semence et on prélève avec une anse de platine 1/100 de centimètre cube de l'émulsion qu'on étend uniformément sur un tube de gélose. Etuve à 37°. Après 18 heures, on observe par exemple 51 plages dans la couche microbienne. Le calcul est alors simple. Chaque centimètre cube de l'émulsion a reçu 1/50.000 × 10, soit 1/500.000 de bactériophage, dont on prélève ensuite 1/100, soit 1/500.000×100 = 1/50.000.000 donnant 51 colonies provenant d'autant d'ultra-microbes bactériophages, soit pour 1 centimètre cube 51 × 50.000.000 = 2.550.000 germes lytiques.

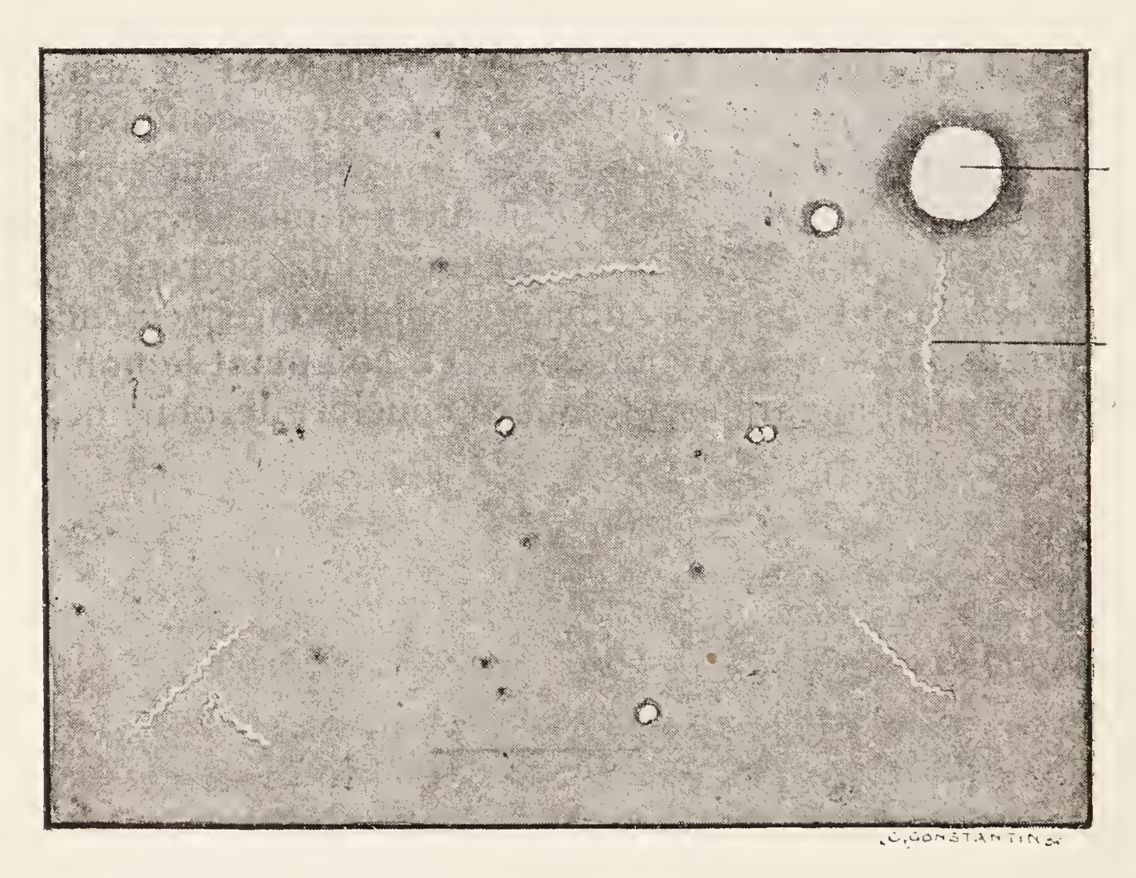
Exaltation de l'activité du bactériophage. — Quand l'ensemencement sur gélose décèle la présence d'un bactériophage dans une émulsion en bouillon, on filtre celle-ci sur terre d'infusoires, puis sur bougie. On prépare une émulsion faiblement louche de la bactérie vis-à-vis de laquelle le bactériophage s'est montré actif; on y ajoute 4 à 5 gouttes de filtrat et on laisse à l'étuve, à 37°, pendant 24 heures. Si la lyse n'est pas complète, on filtre cette seconde émulsion, on introduit 3 à 4 gouttes de filtrat dans une suspension légère de la même bactérie et on continue ces passages jusqu'à ce que le milieu devienne clair. A chaque repiquage, on recherche l'abondance du bactériophage en ensemençant un tube de gélose avec l'émulsion et en comptant le nombre des plages qui apparaissent dans la couche microbienne.

CHAPITRE XLII

SYPHILIS. — ICTÈRE INFECTIEUX HÉMORRAGIQUE. SPIROCHÈTES. — TRÉPONÈMES ET SPIRILLES.

A. — **Syphilis.** — *Recherche des spirilles et tréponèmes sans coloration, par l'encre de Chine.*

Recueillir une petite goutte de sérosité qu'on dépose sur une lame. Près d'elle, on dépose une goutte d'encre de Chine de même volume (encre de Chine très fine, marque RAL). On fait le mélange de ces deux gouttes avec le bord



Tréponèmes (frottés à l'encre de Chine). *a.* Cellule. — *b.* Tréponème.

de la lamelle qui sert ensuite à étaler le tout (comme pour un étalement de sang). On sèche rapidement sur la lampe.

On examine sans lamelle, dans une goutte d'huile de

cèdre, avec un objectif à immersion homogène, et ce procédé simple permet d'éviter l'emploi d'un ultra-microscope.

L'encre forme une nappe noire, plus ou moins transparente et uniforme, sur laquelle se détachent avec une remarquable netteté tous les corps étrangers (globules sanguins, microbes, tréponèmes, etc...) apportés par la goutte de sérosité.

Les tréponèmes pâles, en particulier, apparaissent avec tous les caractères fondamentaux qui les font différencier des autres spirochètes non spécifiques.

Coloration des tréponèmes. — a) *Procédé de Giemsa.* — Fixer sur lames par immersion 30 minutes dans alcool absolu. Colorer pendant 2 à 4 heures (à l'étuve à 37°) dans :

Liquide de Giemsa.	X gouttes
Sol. carbonate de soude à 1 p 100. . .	X gtt.
Eau distillée.	10 cc.

Laver à l'eau, sécher.

Les coupes provenant de tissus fixés dans le formol à 4 p. 100 et lavées à l'eau, sont colorées, d'abord dans un premier bain pendant 1 heure par le Giemsa, puis pendant 12 à 24 heures dans un second bain frais. On lave ensuite rapidement à l'eau distillée, puis pendant quelques secondes (2 à 4) dans une solution concentrée d'alun de potasse, puis dans l'eau distillée. On sèche enfin à l'étuve et on monte dans le baume ou dans la gélatine glycérinée.

b) *Procédé de Borrel et Burnet.* — Exciser un petit fragment de tissu pathologique (chancre, papule, etc.). Le porter successivement sur plusieurs lames où l'on a déposé une goutte d'eau distillée. Gratter et dissocier le tissu avec la pointe d'un bistouri ou d'une aiguille ; le produit de grattage se répand dans la goutte. Sécher à l'étuve. Mordancer en versant sur la lame quelques gouttes de mordant de fuchsine de Löffler (tanin, sulfate ferreux, fuchsine) utilisé pour la coloration des cils.

On répète le mordançage 3 ou 4 fois, en chauffant jusqu'à émission de vapeurs.

On verse ensuite (sans laver) sur la lame quelques gouttes de fuchsine de Ziehl et on chauffe de nouveau jusqu'à émission de vapeurs.

On rince à l'eau, on sèche, éclaircit au xylol et on examine dans une goutte d'huile à immersion.

c) *Procédé de Ravaut à l'albuminate d'argent.* — Etaler le produit sur lame dégraissée à l'éther. Fixer par alcool-éther. Verser sur le frottis 5 à 10 gouttes de solution d'albuminate :

Albuminate d'argent.	2 gr.
Eau distillée.	100 cc.

Chauffer la lame sur veilleuse de Bunsen ou sur platine chauffante jusqu'à émission de vapeurs ; égoutter l'excès d'albuminate. Ne pas laver. Déposer sur le frottis 5 à 10 gouttes de solution d'acide pyrogallique, laver abondamment.

Recommencer cette série de manipulations 3 ou 4 fois. Après le dernier lavage, sécher et examiner.

Les spirilles apparaissent en noir foncé et on constate qu'ils sont presque tous finement spiralés.

d) *Procédé Levaditi* (coupes). — 1° Fixation des fragments d'organes au formol à 10 p. 100, 24 heures ;

2° Durcissement par alcool à 95° pendant 24 heures ;

3° Lavage à l'eau distillée, quelques minutes ;

4° Imprégnation au nitrate d'argent, solution aqueuse à 1,5 p. 100, pendant 3 à 5 jours à 38° ;

5° Lavage à l'eau distillée pendant quelques minutes, puis :

6° Réduction, pendant 24 à 48 heures, par :

Acide pyrogallique.	4 gr.
Formol (sol. commerciale à 40 p. 100). . . .	5 cc.
Eau.	100 cc.

7° Lavage à l'eau distillée. Déshydrater à l'alcool. Xylol. Paraffine. Faire les coupes.

8° Colorer les coupes par le Giemsa dilué au 1/20e, 3 à 4 minutes. Différencier à l'alcool, essence de girofle, xylol, baume.

Méthode de Fontana-Tribondeau (recommandée pour la recherche des tréponèmes dans le cerveau des paralytiques généraux).

Etaler sur lame une goutte d'émulsion d'écorce cérébrale faite en dissociant 2 à 3 millimètres cubes de tissu dans

2 ou 3 gouttes d'eau salée physiologique. Fixer pendant 1 minute par :

Acide acétique.	1 cc.
Formol à 40 0/0.	2 cc.
Eau distillée.	100 cc.

Laver à l'eau courante. Mordancer à chaud, sur la veilleuse du bec Bunsen, par quelques gouttes de la solution suivante :

Acide phénique pur liquéfié par fusion au bain-marie.	1 cc.
Tanin à l'éther.	5 gr.
Eau distillée.	100 cc.

Laver à l'eau courante. Imprégner, toujours à chaud, sur la veilleuse, pendant 30 secondes et jusqu'à dégagement de vapeurs avec :

Nitrate d'argent.	0 gr. 25
Eau distillée.	100 cc.

Ammoniaque q. s. pour redissoudre tout le précipité formé par l'addition des premières gouttes.

Laver à l'eau courante, sécher.

Les tréponèmes apparaissent colorés en brun noir sur fond jaune. Les fibrilles nerveuses sont jaune clair.

f) *Panchrome Laveran* (Institut Pasteur).

Etaler sur lame le produit suspect. Sécher. Déposer sur la lame 0 cc. 25 de panchrome. Laisser agir 3 minutes (fixation) en ayant soin de couvrir la lame. Ajouter 5 centimètres cubes d'eau distillée (que l'on aura fait bouillir préalablement 5 à 10 minutes dans un ballon de verre pour la rendre légèrement alcaline) à 0 cc. 25 de panchrome. Laisser agir pendant 20 à 30 minutes. Laver à grande eau. Sécher.

g) *Méthode de Noguchi pour la culture directe de Treponema pallidum à partir des lésions syphilitiques humaines.*

Le milieu de culture se compose de deux parties de gélose à 2 % légèrement alcaline, et une partie de liquide d'ascite ou d'hydrocèle (les sérums de cheval ou de mouton peuvent également être employés, mais sont moins favorables). L'addition d'un fragment de tissu (rein ou testicule de lapin) est indispensable. Au-dessus de la gélose ascite, verser une couche d'huile de paraffine stérile, de 3 centi-

mètres d'épaisseur. Insérer les fragments ensemencés avec une baguette de verre ou une spatule, sans faire éclater le milieu. A l'étuve, à 37°, pendant deux ou trois semaines. Pour les repiquages, nécessaires pour éliminer les impuretés qui se sont développées le long de la strie d'ensemencement, puiser dans la région louche à distance de l'axe. Assez souvent le tréponème se développe sans qu'on voie un louche ; parfois on observe un louche dû à l'acidité et non à un développement du tréponème. La culture commence vers la 62e heure et croît pendant 2-3 semaines.

h) *Réaction de Bordet-Wassermann* (voir *chap. XXII*).

* * *

B. — Ictère infectieux.

(*Spirochétose ictéro-hémorragique*, *Typhoïde bilieuse*, *Maladie de Weil ou ictère à rechute*.)

Spirochæte ictero-hemorragiæ (*Inada* et *Ito*).

Coloration (dans le foie principalement) par la méthode de Giemsa, bain prolongé ; 1 goutte pour 1 centimètre cube d'eau distillée, 12 heures.

Le parasite est très difficile à trouver dans le sang des malades. *Il n'y existe qu'au début de la maladie, avant l'apparition de l'ictère et pendant les deux premiers jours.* Mais il est très abondant dans la glande hépatique. Il persiste plus longtemps dans l'urine (parfois jusqu'à 6 semaines et même trois mois). On le retrouve aisément chez le cobaye, dans le foie, les reins, le sang, la vésicule biliaire et presque dans tous les organes. Mince filament spiralé de 6 à 9 ou plus long (jusqu'à 25) ; ordinairement à 2 ou 3 spires ; paraît entouré d'un halo à l'ultramicroscope.

Expérimentation. — Cobaye très sensible à l'inoculation du virus, surtout par voie intrapéritonéale (5 centimètres cubes de sang ou d'urine du malade) et intracardiaque. Mais l'animal peut être infecté par la peau, épilée ou rasée, par les muqueuses saines, par simple instillation sur l'œil, par les voies digestives, avec 1 à 2 centimètres cubes de sang humain virulent. Trois jours après, l'animal est malade, son foie fourmille de spirochètes. Il meurt du

4e au 8e ou 10e jour en hypothermie, avec des hémorragies dans le tissu graisseux des aines ou de l'aisselle, des reins, des muscles ; des infarcti dans les poumons et de la dégénérescence graisseuse du foie.

On peut aisément faire des passages du virus de cobaye à cobaye. Le lapin est peu sensible. Les singes, rats, souris, chiens (sauf les jeunes chiens), chats, porcelets, moutons, ânes, poules, etc., sont insensibles.

Les déjections, et particulièrement l'urine, des malades et des animaux infectés, sont susceptibles de propager la maladie.

Le sérum des sujets guéris contient des substances protectrices : 0 cc. 001 de sérum suffit à annihiler, *in vitro*, la virulence de 1 centimètre cube de sang virulent. Il est encore actif après 7 mois et ne s'affaiblit qu'après 1 an. 1 à 2 centimètres cubes de sérum de convalescent peuvent guérir le cobaye infecté depuis 3 jours.

Le foie de cobaye infecté peut servir d'antigène pour diagnostiquer la maladie par la réaction de Bordet-Gengou avec le sérum des malades.

Le virus se conserve plusieurs jours actif dans le sang et la bouillie d'organes, à la glacière ; 7 jours dans le sang citraté, à la température du laboratoire. La dessiccation à 37° le tue en 3 heures ; à la température du laboratoire en 10 heures. Le chauffage à 50°, en moins de 30 minutes. Il est très sensible aux antiseptiques et à la bile. Il résiste à la chimiothérapie par le néosalvarsan, l'émétique, l'atoxyl, le collargol, etc.

Le rôle des insectes (punaises, puces, etc.) dans la transmission de la maladie n'est pas encore précisé, mais il est probable. Les rats, surtout le *Mus decumanus*, servent d'hôtes intermédiaires et de réservoirs de virus. La maladie peut se transmettre par morsure du rat. On a observé des infections de laboratoire produites par contact direct du virus sur la muqueuse oculaire.

Culture. — Elle peut se faire dans l'eau de robinet additionnée de 1 p. 30 de sérum de lapin, en partant de fragments de foie de cobaye infecté qu'on recouvre préalablement d'eau physiologique. Au bout d'une demi-heure, le liquide surnageant, distribué en tubes, est additionné de sérum de lapin, puis d'huile de paraffine, et porté à l'étuve

à 35°. Du 3e au 6e jour les spirochètes apparaissent nombreux. Il faut repiquer les cultures tous les 7 jours. Elles restent ainsi virulentes. La présence d'hémoglobine dans le milieu entrave le développement.

Milieu au sérum dilué. — A quatre ou cinq parties d'eau physiologique, ajouter une partie de sérum de lapin (exempt d'hémoglobine). Stériliser par filtration à la bougie Chamberland L_3. Répartir à raison de 10 centimètres cubes par tube dans des tubes préalablement flambés contenant un centimètre cube d'huile de vaseline stérilisée. Terminer la stérilisation par chauffage discontinu à 56° trois jours de suite, à 24 heures d'intervalle, pendant 30 minutes.

Aux tubes du milieu ainsi préparé, on peut ajouter un fragment d'organe (rein, testicule de lapin) prélevé aseptiquement.

Milieu à l'extrait globulaire. — 1° Ecraser des caillots de sang de cheval sur un tamis et ajouter à la bouillie deux fois son volume d'eau physiologique à 8 p. 1.000.

2° Chauffer à 75° pendant 15 à 30 minutes, filtrer sur papier Laurent, filtrer sur bougie Chamberland L_3, ajouter une faible quantité de sérum stérile de lapin (5 %), stériliser par chauffage discontinu à 56° trois jours de suite, à 24 heures d'intervalle, pendant 30 minutes.

*
* *

C. — Fièvre jaune.

Leptospira icteroïdes (Noguchi). — Noguchi a constaté et isolé, dans le sang des malades atteints de fièvre jaune, un spirochète qui se rapproche de celui de la spirochétose ictéro-hémorragique, mais qui en diffère par certains caractères. *Leptospira icteroïdes* est un fin filament mobile, à extrémités effilées de 4 à 9 μ de longueur, à spires courtes et régulières.

Coloration. — Fixer par l'acide osmique, colorer par la méthode de Giemsa ou celle de Fontana-Tribondeau.

Culture. — Noguchi superpose dans un long tube, à raison de 8 centimètres cubes chacun, deux milieux : un, demi-solide dans le fond, un, liquide au-dessus. Le milieu liquide comprend une partie de sérum humain normal et trois par-

ties de solution de Ringer. Le milieu demi-solide est obtenu en ajoutant au milieu précédent 0,3 p. 100 de gélose.

Pour l'ensemencement, on porte le milieu demi-solide à 42° pour le liquéfier, on y verse 0,5 à 1 centimètre cube de sang citraté du malade ; après refroidissement ajouter le milieu liquide qu'on ensemence avec 0,5 à 1 centimètre cube de sang citraté. Verser à la surface une couche d'huile de paraffine.

A 37°, le développement est rapide, mais le spirochète perd rapidement sa vitalité. Il la conserve plus longtemps à 25°.

Inoculation aux animaux. — Les cultures ainsi obtenues donnent au cobaye la fièvre jaune expérimentale. De même l'inoculation intrapéritonéale de sang malade. L'animal inoculé, après une incubation de 3 à 6 jours, présente une élévation de température accompagnée d'albuminurie, cylindrurie, oligurie et hypérémie, surtout au niveau des conjonctives et des oreilles, s'accompagnant de suffusions sanguines. Après quelques jours, la fièvre tombe en lysis. A ce moment l'ictère apparaît, il s'accompagne d'hémorragies au niveau des muqueuses, puis l'animal meurt.

Réactions humorales. — *Phénomène de Pfeiffer.* — Mélanger du sérum de convalescent à une culture de *Leptospira icteroides* et injecter le mélange dans le péritoine de cobaye. Dans 83 p. 100 des cas, on constate la lyse du parasite alors que les résultats sont négatifs avec les témoins.

Le sérum de convalescent protège le cobaye contre l'infection expérimentale.

Les sérums préparés par injections de *L. icteroïdes* à des animaux réfractaires (cheval, lapin) sont doués de propriétés agglutinantes et bactéricides indiscutables vis-à-vis de ce germe et n'ont aucune action sur *Spir. icterohemoragiæ*. De même pour le pouvoir neutralisant à l'égard de l'infection expérimentale déterminée par ce parasite.

*
* *

D. — Fièvre récurrente et tick fever.

(*Spirochæta recurrentis et Spirochæta duttoni.*)

Coloration. — 1° *Du sang étalé sur lames.* Le procédé de choix est la coloration par le liquide de Giemsa.

On peut aussi employer le violet aniliné d'Ehrlich, mais il faut d'abord dissoudre l'hémoglobine.

Pour cela, verser sur la préparation de l'eau acétisée à 5 p. 100 ; laisser en contact pendant trente secondes. Puis faire agir pendant quelques secondes des vapeurs d'ammoniaque et laver à l'eau distillée.

Les spirilles et les globules blancs sont colorés en violet, les hématies sont incolores.

2° *Dans les coupes. Procédé de Nikiof.* — Tremper les coupes pendant vingt-quatre heures dans le colorant suivant :

Sol. aq. de bleu de méthylène.	10 cc.
Sol. alcool. de tropéoline à 1 p. 100. . . .	1 cc.
Sol. de potasse à 1 p. 10.	IV gtt.
Eau distillée.	10 cc.

Laver à l'eau, puis à l'alcool-éther, xylol, puis monter.

Expérimentation. — Le spirochète de la récurrente est facilement inoculable au singe, difficilement au début au rat et à la souris. Le spirochète de la *tick fever* se transmet facilement aux rats, souris, cobaye, mouton et singe.

Diagnostic bactériologique. — Recherche directe du spirille.

1° Examen, à l'état frais, du sang prélevé pendant un accès fébrile. Colorer au Giemsa dù sang étalé sur lame et fixé par l'alcool.

2° Entre deux accès ou pendant la convalescence, rechercher le pouvoir agglutinant du sérum du malade vis-à-vis d'un virus homologue.

Culture. — *Procédé de Noguchi.* — Noguchi a réussi à cultiver les divers spirochètes sanguicoles dans des milieux semi-solides.

Eau physiologique stérile.	80 cc.
Sérum de lapin frais et stérile.	10 cc.
Milieu à l'agar 2 0/0 (pH, 7.2) fondu et refroidi à 45°.	10 cc.
Solution stérile d'hémoglobine.	0,5 cc.

Laisser solidifier en tubes droits. Ensemencer quelques gouttes de sang citraté ou de culture dans le milieu et recouvrir de 1 à 2 centimètres cubes d'huile de vaseline.

Le développement se fait à la partie supérieure du milieu, dans une zone de 1 centimètre environ. Il commence le 5e jour. Repiquer toutes les semaines.

Procédé d'Ungermann. — Plus simple que le précédent. Cet auteur emploie du sérum de lapin jeune, frais et inactivé à 58-60° sous une couche d'huile de vaseline. Se servir de petits tubes de 9 millimètres de diamètre, dans lesquels on verse 0 cc. 5 de sérum recouvert d'huile de vaseline. La culture se fait bien à 37°. A 30°, elle se développe aussi vite et se conserve plus longtemps.

Repiquer tous les 5 jours, avant que la multiplication n'ait atteint son maximum. Ce milieu convient parfaitement pour le spirochète des poules Pour celui de la fièvre récurrente, il vaut mieux ajouter au sérum inactivé quelques gouttes de sang frais de lapin. La culture se fait même à 37°.

CHAPITRE XLIII

TRYPANOSOMES. — LEISHMANIES. — HÉMATOZOAIRES. PIROPLASMES.

I. — **Trypanosomes.**

Les *trypanosomes* sont des flagellés à membrane ondulante bordée par un flagelle qui se termine en avant par une partie libre ; noyau, blépharoplaste ou centrosome. Ce sont des parasites du sang des vertébrés.

A. — ***Recherche des trypanosomes dans le sang.*** — 1° Examen du sang entre lame et lamelle à l'état frais ; 2° coloration des frottis de sang.

Etaler sur une lame, en couche mince, une goutte de sang de l'animal trypanosomé. Dessécher rapidement en agitant la lame.

Procédé de Giemsa.

Fixer le frottis en le recouvrant pendant une dizaine de minutes d'alcool absolu jusqu'à évaporation, puis colorer par la solution de Giemsa.

a) *Coloration rapide.* — Colorer pendant 40 à 50 minutes par la solution de Giemsa obtenue en mélangeant un centimètre cube de colorant de Giemsa avec 20 centimètres cubes d'eau légèrement alcaline. Verser ce mélange dans une boîte de Laveran, où l'on dépose la lame, frottis en bas, de façon à éviter le dépôt des précipités. Laver rapidement à l'eau.

b) *Coloration lente.* — Diluer le colorant de Giemsa à 1/2 centimètre cube pour 20 centimètres cubes d'eau. Laisser en contact pendant 16 heures dans une boîte de Laveran. S'il y a surcoloration, différencier rapidement au tanin à 5 p. 100.

Procédé panoptique. — Sur un frottis non fixé, verser

XV gouttes de la solution de May-Grünwald. Recouvrir d'un couvercle de boîte de Pétri pour empêcher l'évaporation. Après 3 minutes de contact, ajouter XV gouttes d'eau distillée. Au bout d'une minute, rejeter le colorant et, sans laver, verser sur le frottis la solution de Giemsa diluée (III gouttes pour 1 centimètre cube d'eau de robinet). Laisser une heure, laver et sécher.

3° Coloration des coupes (par exemple de *Schizotrypanum Cruzi* dans les muscles).

Procédé de Laveran. — Préparer le mélange suivant au moment de l'emploi :

Eosine à 1 p. 1.000.	4 parties.
Eau distillée	10 parties.

Verser ce mélange dans une boîte de Laveran, ajouter 1 partie de bleu Borrel à l'argent, déposer la coupe face en bas. Laisser colorer 20 minutes. Laver rapidement à l'eau

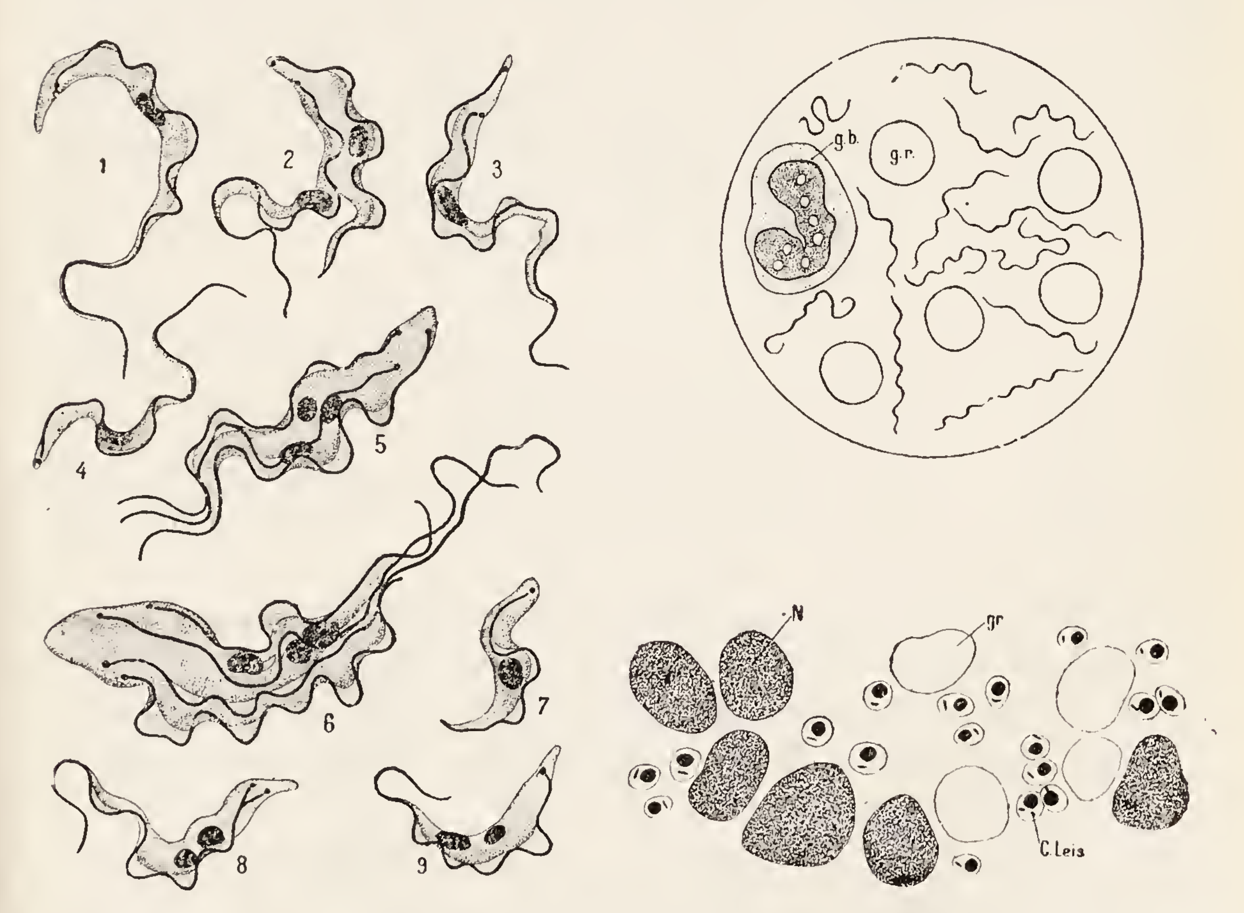


Fig. 14 (à gauche). *Trypanosoma gambiense* dans le sang du rat : 1 et 4, formes adultes ; 2, 3, 8, 9, différents stades de la division en deux ; 5, 6, divisions multiples ; 7, forme jeune sans flagelle (d'après Brumpt).
Fig. (en haut à droite). Spirochètes de la *tick fever* abyssine dans le sang du rat ; g, b, globule blanc ; g, r, globules rouges (d'après Brumpt).
Fig. (en bas à droite) Corps de Leishman dans un frottis de pulpe splénique ; *C. Leis. Leishmania*, gr, globule rouge, N, noyaux de mononucléaires (d'après Brumpt).

courante et différencier quelques secondes au tanin orange ou à la solution aqueuse de tanin à 5 p. 100. Laver à l'eau, sécher.

*
* *

B. — ***Culture des trypanosomes***. — Se fait dans le liquide de condensation de la gélose au sang de Novy et Mac Neal-Nicolle (Milieu N. N. N.) (voir page 48).

La culture des trypanosomes non pathogènes est facile. Celle des trypanosomes pathogènes est difficile, sauf *Schizotrypanum Cruzi.*

*
* *

C. — ***Trypanosomiases humaines. Trypanosomiase africaine causée par Trypanosoma gambiense***. — 1° *Recherche des trypanosomes dans un ganglion.* — Au début de la maladie, ponction d'un ganglion. Examen direct, à l'état frais, d'une goutte de lymphe entre lame et lamelle pour la recherche des trypanosomes vivants.

2° *Recherche des parasites dans le sang* :

a) Examiner le sang à l'état frais entre lame et lamelle. Chez les malades non traités et récemment infectés, les trypanosomes sont le plus souvent rares ;

b) Observer si les hématies présentent de l'auto-agglutination ;

c) Rechercher les parasites après centrifugation du sang. Pour cela, recueillir 10 centimètres cubes de sang de la veine du pli du coude dans un tube à centrifuger contenant 1 centimètre cube d'une solution de citrate de soude à 10 p. 100 ; bien mélanger.

Centrifuger pendant 15-20 minutes jusqu'à ce que le liquide surnageant soit clair.

Décanter avec soin et prélever, immédiatement après la centrifugation, à la pipette, la couche superficielle du dépôt contenant les leucocytes. Examiner entre lame et lamelle.

Principaux trypanosomes des animaux.

	Découvert par	Dimensions du trypanosome	Maladies	Animaux parasités	Transmission par	Répartition géographique
T. Brucei	Bruce 1894	20-30 μ sur 1,5-2 μ	Nagana	Cheval, âne, bœuf, chien	Glossina morsitans et fusca	Afrique
T. Cazalboui	Laveran 1906		Souma	Bovidés et Equidés	Afrique occidentale française	Glossines
T. dimorphon	Dutton et Todd 1904	20-30 μ sur 1,5-2 μ extrémité post. élargie	Trypanosomiase des chevaux de Gambie	Chevaux	Glossina palpalis	Sénégambie
T. equinum	Elmassian 1901	20-25 μ sur 3-4 μ semblable au Brucei mais petit centrosome	Mal de Caderas	Equidés		Amérique du Sud
T. equiperdum	Rouget 1894	25-28 μ sur 2 μ extrémité post. bifide	Dourine	Equidés	Coït	Europe, Afrique, Nord, Asie mineure
T. Evansi	Evans 1880	Semblable à T. Brucei	Surra	Equidés, chameaux Bovidés, chiens	Tabanides Stomoxes	Inde, Indo-Chine Philippines Afrique du Nord
T. Lewisi	Lewis 1878		non pathogène	Rats (mus rattus decumanus rufescens	Puces et pou des rats	
T. Pecaudi	Laveran 1907	Ressemble à T. Gambiense	Baleri	Equidés et Bovidés	Glossina longipalpalis	Soudan et Côte orientale Afrique
T. Theileri	Theiler 1902			Bovidés		Afrique australe

d) Inoculer à 2 ou 3 cobayes, sous la peau, 6 centimètres cubes de sang. Examiner le sang des animaux 15 à 20 jours après l'inoculation.

3° *Recherche des parasites dans le liquide céphalo-rachidien.* — Cette recherche présente une grande importance au point de vue du pronostic.

Centrifuger 5 centimètres cubes de liquide. Décanter et prélever le dépôt avec une pipette. Déposer une goutte entre lame et lamelle. Si l'examen est négatif, inoculer le culot de centrifugation sous la peau du cobaye.

Lorsqu'un de ces examens a révélé un parasite vivant, il est utile, pour le diagnostic du parasite, de pratiquer une coloration par le procédé de Giemsa ou les procédés analogues.

D. — ***Trypanosomiase américaine ou Maladie de C. Chagas, causée par Schizotrypanum Cruzi.*** — Ce parasite se distingue des autres trypanosomes par son évolution schizogonique. Il infecte l'homme et beaucoup d'animaux domestiques ou sauvages. Il est transmis dans la nature par un hémiptère : *Conorhinus megistus.*

*
* *

II. — **Leishmanies.**

Parasites généralement intracellulaires avec noyau et centrosome bacillaire d'où l'on peut voir partir un flagelle interne (*rhizoplaste* de Novy), dimensions 2-4 μ × 1-2 μ formes ovoïdes, parfois bacillaires. En culture, donnent des flagellés du type *Leptomonas* ou *Herpetomonas* de 15-20 μ × 1,5-4 μ pourvus d'un long flagelle s'insérant à l'extrémité antérieure du corps. Multiplication : généralement par division binaire, longitudinale ; division multiple des éléments leishmaniens. Espèces : *Leishmania donovani* (Kala-azar indien), *Leishmania tropica* (Bouton d'Orient) *Leishmania infantum* (splénomégalie infantile).

Matériel de recherche pour le diagnostic. — Pour les leishmanioses cutanées, nettoyer les ulcérations et racler légèrement les tissus. Faire des frottis avec le produit du raclage.

Ponctionner avec une fine pipette les lésions non ulcérées, étaler sur lame le suc aspiré et l'ensemencer.

Pour les leishmanioses viscérales, les recherches doivent porter sur le sang, les ganglions, le foie et la rate, la moelle des os, la sérosité d'un vésicatoire (*Cummins* et *Ch. Nicolle*).

La ponction du foie se fait en enfonçant une aiguille à ponction lombaire dans cet organe après asepsie de la peau à la teinture d'iode ; aspirer avec une seringue stérile et sécher. Retirer l'aiguille d'un geste brusque et déposer sur lame, par refoulement, le petit cylindre de tissu prélevé, l'étaler et le colorer.

Pour la ponction de la rate dont le tissu est plus fragile, il faut observer les précautions indiquées par Ch. Nicolle afin d'éviter les hémorragies ou les ruptures ; faire coucher le malade sur le côté en le faisant maintenir par un aide. Après asepsie de la peau à la teinture d'iode, ponctionner en pleine matité splénique avec une aiguille assez longue, *fine* et *neuve*. Les aiguilles épaisses, rouillées ou rugueuses risquent de déchirer le tissu splénique. Aspirer avec la seringue, puis retirer l'aiguille d'un coup sec.

Cultures. — La culture des Leishmanies se fait à 22° dans le liquide de condensation de la gélose au sang (Milieu N.N.N.). Elles peuvent être repiquées indéfiniment.

Coloration. — La coloration se fait par les méthodes dérivées du Romanowsky.

Les cellules infectées sont réparties dans la rate, la moelle osseuse, le foie dans les leishmanioses internes ; dans les cellules granulomateuses lors de leishmanioses locales Toutes les catégories de cellules mésodermiques ayant le pouvoir phagocytaire peuvent être parasitées.

Dans les leishmanioses internes, le sang contient presque toujours de rares parasites, décelables à l'examen direct, surtout dans le kala-azar indien, et pouvant se développer dans les cultures. Dans les leishmanioses locales, les parasites doivent quelquefois aller dans la circulation sanguine.

Leucopénie dans les leishmanioses internes ; moins de 4.000 leucocytes avec moins de 50 p. 100 de polynucléaires et 20 p. 100 ou plus de grands mononucléaires.

*
* *

III. — Hématozoaires du paludisme.

Plasmodium malariæ (*Fièvre quarte*).

Plasmodium vivax (*Fièvre tierce bénigne*).

Plasmodium præcox (ou *falciparum*) (*Fièvre tropicale ou tierce maligne*).

Transmission par les Anophélinés.

La recherche du parasite du paludisme doit être faite dans le sang durant l'accès ou les heures qui le précèdent. Se rappeler que le traitement par la quinine fait disparaître les hématozoaires, sauf les croissants qui lui résistent bien.

Le sang est prélevé par piqûre du doigt ou du lobule de l'oreille. Les parasites peuvent être recherchés à l'état frais ou après coloration :

1° *Examen à l'état frais.* — Recueillir la goutte de sang sur une lame très propre, bien débarrassée des matières grasses qui empêchent la répartition uniforme du liquide. Recouvrir d'une lamelle.

Observer au microscope avec un éclairage de moyenne intensité et en diaphragmant.

L'examen à l'état frais permet de découvrir surtout les formes pigmentées. Il est plus difficile de voir les formes jeunes sans coloration.

Les *parasites* doivent être recherchés dans les globules rouges où on les perçoit sous forme de petites taches de protoplasma pâle, à contours souvent imprécis, contenant des grains de pigment noir.

Les leucocytes mélanifères (le plus souvent grands mononucléaires) sont reconnaissables aux déchets parasitaires qu'ils ont phagocytés.

Ne pas prendre pour des parasites les vacuoles des globules rouges qui sont à contours nets, arrondis, ni les hématoblastes qui peuvent être fixés sur un globule rouge.

Ne pas prendre pour du pigment les granulations réfringentes des éosinophiles, ni celles des lymphocytes, ni les grains de poussière.

2° *Examen après coloration.* — La goutte de sang doit être

Caractères différentiels des trois espèces de Plasmodium. — (D'après *Brumpt.*)

	P. Malariæ	P. Vivax	P. falciparum ou præcox
Formes jeunes	Contours très nets, mouvements amiboïdes très lents	Contours peu distincts, mouvements amiboïdes vifs. 1/5 du globule	Contours nets mouvements amiboïdes vifs ; 1/8 du globule
Schizontes mûrs	Quadrilatères plus petits qu'une hématie normale	Ronds, plus grands qu'une hématie normale	Ronds, diamètre égal au rayon d'une hématie
Pigment	Grains grossiers, irréguliers, peu ou pas mobiles	Grains en bâtonnets, très mobiles dans le protoplasma ; ou collectés en un point de la périphérie	Grains peu nombreux (2 à 3) petits et irréguliers ; peu mobiles ; en général au centre
Hématies parasitées	*Rétractées*, plus foncées que les hématies normales. La coloration ne décèle aucune granulation protoplasmique	*Hypertrophiées*, molles, de couleur pâle. La coloration met en évidence les granulations de Schüffner.	*Normales.* La coloration met en évidence les granulations volumineuses de Maurer
Schizogonie	La forme en rosace est nette, on la rencontre dans le sang périphé rique	Segmentation en calotte sphérique se rencontre fréquemment dans le sang périphérique	Segmentation en rosace ou irrégulière, se fait dans les capillaires des viscères
Nombre de mérozoïtes	6 à 12	15 à 20	8 à 10, quelquefois davantage
Gamètes	Sphériques	Sphériques	En forme de croissants, devenant rarement sphériques dans le sang
Evolution	72 heures	48 heures	De 24 à 48 heures
Forme clinique de fièvre	Quarte, simple, double, triple	Tierce, simple ou double	Quotidienne, tierce maligne, estivo automnale
Incubation	Trois semaines	14 jours	10 à 12 jours

EXPLICATION DE LA PLANCHE

(empruntée à Armand-Delille)

Plasmodium vivax (Var. tertiana Laveran).

1. *Schizonte jeune* (sporozoïte venant de pénétrer dans le globule).
2. *Schizonte.*
3. *Corps amœboïde* dans un globule hypertrophié présentant des granulations de Schüffner
4. *Corps amœboïde* en voie de segmentation, dans un globule très hypertrophié.
5. *Corps en rosace.*
6. *Macrogamète jeune.*
7. *Macrogamète adulte.*
8. *Microgamétocyte.*

8 *bis. Macrogamète* en schizogonie régressive.

Plasmodium Falciparum (Var. parva Laveran).

9. *Sporozoïte* accolé à un globule.
10. *Deux schizontes* à l'intérieur d'un globule.
11. *Schizonte* dans un globule présentant des granulations de Maurer.
12. *Trois schizontes* dans un globule avec granulations de Maurer.
13. *Corps en rosace.*
14. *Gamète jeune intraglobulaire.*
15. *Macrogamète adulte* (corps en croissant type).
16. *Microgamétocyte adulte* (microgamétocyte).

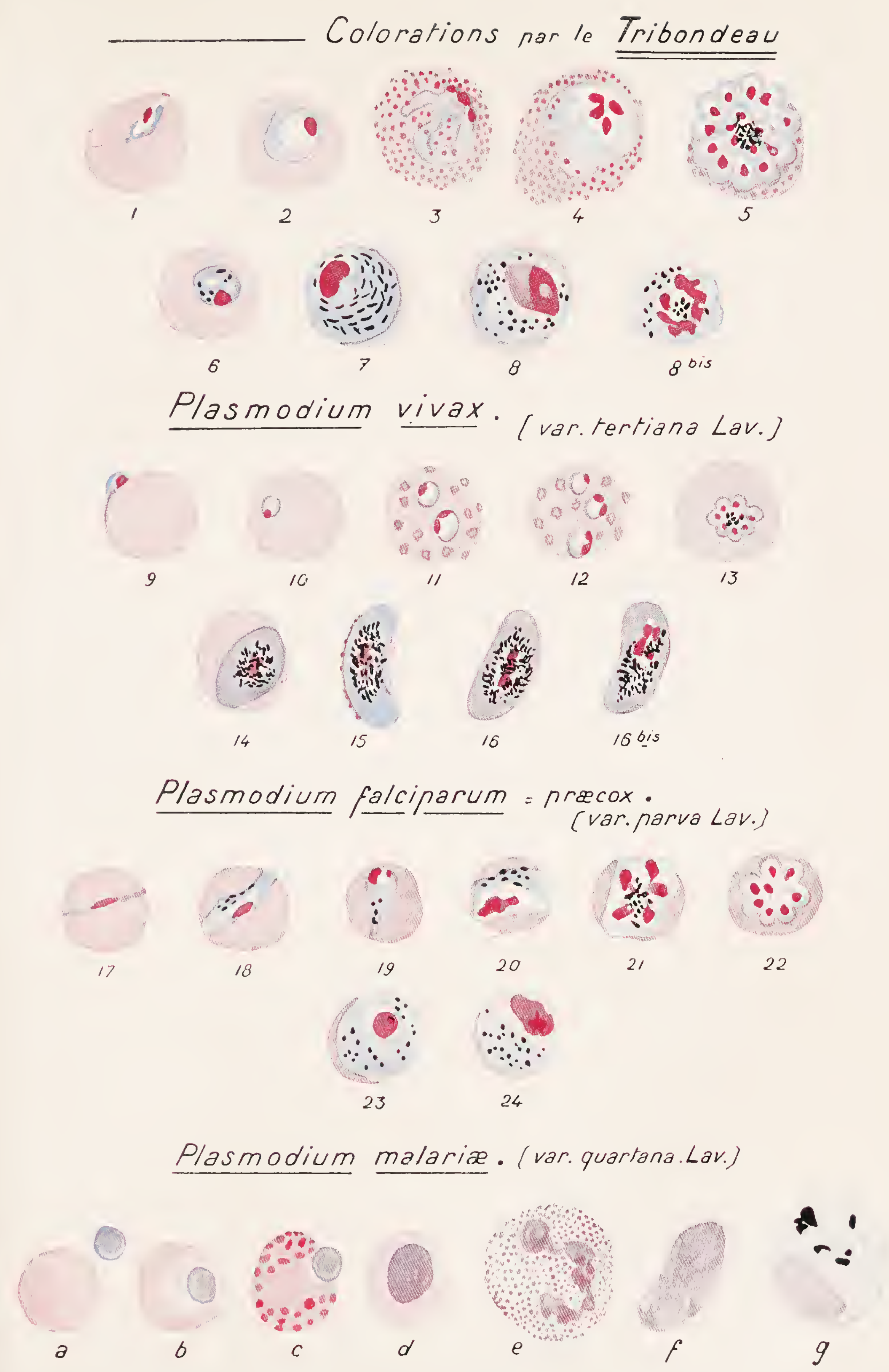
16 *bis. Gamète* peut-être en schizogonie régressive ?

Plasmodium malariæ (Var. quartarna Laveran).

17. *Schizonte jeune* dans un globule non hypertrophié.
18. *Schizonte plus développé et pigmenté.*
19. *Schizonte en poire.*
20. *Schizonte âgé* très pigmenté.
21. *Schizonte* en voie de segmentation.
22. *Corps en marguerite.*
23. *Macrogamète.*
24. *Microgamétocyte.*

Globules rouges. Hématoblastes et leucocytes.

a *Globule rouge* et *hématoblaste.*
b *Hématoblaste* sur un globule rouge pouvant simuler un schizonte.
c *Globule rouge* présentant des granulations artificielles (précipités de matière colorante) avec un hématoblaste sur son bord (Cause d'erreur).
d *Hématie nucléée.*
e *Leucocyte polynucléaire* à granulations neutrophiles.
f *Leucocyte mononucléaire déformé.*
g *Leucocyte mélanifère* avec quelques granulations azurophiles.



P. Armand-Delille del.

Masson et Cie, éditeurs.

étalée sur la lame comme il a été indiqué. Sécher la lame en l'agitant en l'air, mais pas sur la flamme d'une lampe. Fixer à l'alcool absolu.

Colorer par les méthodes dérivées du Romanowsky (Giemsa, etc.).

Se rappeler, pour éviter les causes d'erreur qui peuvent faire prendre des hématoblastes ou les vacuoles des globules rouges pour des parasites, que ceux-ci doivent présenter un noyau se colorant en rouge et un protoplasme qui apparaît en bleu pâle.

3° *Procédé de la goutte épaisse* (*Leishman*). — Quand les parasites sont rares, il est avantageux d'employer le procédé de la goutte épaisse. Elle a pour but de concentrer sur une surface très réduite les hématozoaires contenus dans un volume déterminé de sang.

On dépose sur une lame 3 à 5 gouttes de sang *sans les étaler*. En s'agglomérant, elles prennent un diamètre de 5 millimètres environ.

Laisser sécher, puis hémolyser par l'eau distillée qui décolore les hématies et laisse intacts les leucocytes et les parasites. Sécher à nouveau, puis colorer par les méthodes classiques.

4° *Culture des Plasmodium*. — *C. C. Bass*, le premier, a cultivé le *Plasmodium vivax* et le *P. falciparum*. Le procédé qu'il a employé est le suivant :

Du sang d'un malade prélevé avec une aiguille à une veine du pli du coude est conduit par un tube de caoutchouc stérile dans un tube de 25 millimètres de diamètre sur 12 à 15 de long, dans lequel il est défibriné avec un agitateur. A ce sang défibriné, on ajoute un dixième de centimètre cube de solution de dextrose ou de maltose à 50 p. 100 par 10 centimètres cubes de sang et on centrifuge de façon à réunir tous les leucocytes à la surface du dépôt cellulaire. On prélève alors le sérum surnageant et on le distribue dans des tubes de culture à fond plat sur une hauteur de 12 à 25 millimètres. On prélève alors des globules rouges vers le milieu du dépôt cellulaire et on ensemence les tubes de sérum à raison d'un à deux dixièmes de centimètre cube de ces globules par tube. Dans ces milieux privés de leucocytes et à la température optima de 40° ou 41°, *Bass* a obtenu des cultures de *Pl. vivax* et de *Pl. falciparum*.

Principales piroplasmoses

	Découvert par	Maladies	Animaux parasités	Transmission par	Répartition géographique	
P. Bigeminum	mith et Kilborne 1893	Mal de Brou Fièvre du Texas, Tristeza	Bovidés	Ixodes	Finlande Afrique Argentine	Parasites endoglobulaires affectant la forme de poires. Multiplication par scission égale ou par bourgeonnement
P. Ovis	Babes 1880	Anémie du mouton avec hémoglobinurie	Mouton	Rhinocephalus bursa	Roumanie, Italie. Turquie, Afrique australe, Indes, France	
P. Canis	Piana et Galli Valerio 1895	Piroplasmose du chien	Chien	Dermacentor reticulatus Hœmaphysalis lœchi	France, Sénégal, Afrique australe, Tonkin	
Theileria parva	Theiler 1904	East Coast fever	Bovidés	Rhipicephalus Evertsi	Côte orientale Afrique, Japon, Indes	Parasites endoglobulaires bacilliformes se divisant en quatre en donnant des formes en croix
Theileria mutans	Theiler 1907	Bétail Transvaal			Transvaal	
Theileria bovis	Babes 1888	Fièvre hémoglobinurique	Bœuf		Europe	
Nuttallia equi	Laveran 1899	Piroplasmose équine	Chevaux	Rhipicephalus decoloratus	Transvaal, Madagascar, Indes	Parasites endoglobulaires ovalaires ou piriformes se multipliant en croix
Anaplasma marginale	Theiler 1910		Bovidés, Porc, Ane, Cheval, Mouton	Boophilus decoloratus	Afrique, australe	Parasites de forme globuleuse ressemblant à un coccus se colorant intensément et vivant à la périphérie des globules rouges de divers vertébrés

*
* *

IV. — Piroplasmes.

Les piroplasmes sont des parasites endoglobulaires qui déterminent des infections chez les bovidés, les ovidés, les équidés, le chien. Ils sont transmis par les *Ixodes* chez lesquels s'effectue la reproduction sexuée. L'infection a lieu par les filles des tiques qui ont sucé le sang des animaux malades.

La coloration s'effectue par les procédés employés pour la coloration de l'hématozoaire du paludisme.

Eosine à 1 p. 1.000.	4 parties
Eau distillée.	10 parties

SIXIÈME PARTIE

PRÉPARATION ET TITRAGE DES VACCINS ET DES SÉRUMS THÉRAPEUTIQUES.

CHAPITRE XLIV

TECHNIQUE DE PRÉPARATION ET DE TITRAGE DES VACCINS MICROBIENS.

La technique de préparation de ces vaccins varie avec les divers microbes pathogènes. Quelques méthodes peuvent toutefois être appliquées à beaucoup d'entre eux.

A. — Vaccins antityphoïdiques.

a) *Méthode de Wright-Leishman.* — Cette méthode fut la première utilisée dans la pratique lors de la guerre du Transvaal.

Des cultures de bacilles typhiques dans du bouillon peptonisé, largement aérées et âgées de 48 heures, sont chauffées au bain-marie à 53° pendant une heure.

Après refroidissement, elles sont additionnées de 0,4 p 100 de lysol. On effectue ensuite le titrage du nombre des éléments microbiens par centimètre cube, suivant la technique de Wright qui sera décrite un peu plus loin (G) et, par addition d'eau salée physiologique, on fait en sorte que chaque centimètre cube contienne 1 milliard de bacilles. Le vaccin est ensuite réparti en petits flacons qu'on scelle à la lampe. On injecte une première fois 1/2 centimètre cube, puis 8 jours après, 1 centimètre cube et, encore 8 jours plus tard, 1 centimètre cube.

Au lieu de cultures en bouillon, on emploie aujourd'hui,

pour la préparation du vaccin destiné aux armées anglaises, des cultures sur gélose nutritive en fioles plates de Roux. Après 48 heures, les microbes sont recueillis par raclage, puis délayés dans de l'eau salée physiologique.

b) *Méthode de Chantemesse.* — Lors de ses premières recherches qui datent de 1887 (avec F. Widal), Chantemesse chauffait à 120°, puis plus tard à 100°, des cultures en bouillon. Mais à cette température le pouvoir vaccinant est à peu près complètement détruit. Le vaccin actuel de Chantemesse est préparé de la manière suivante, très analogue à celle de Wright :

Une émulsion de culture sur gélose âgée de 24 heures est diluée dans une quantité d'eau salée physiologique stérile, telle que chaque centimètre cube renferme 1 milliard à 1 milliard 200 millions de germes. On chauffe au bain-marie à 56° pendant 45 minutes; on ajoute 2,5 p. 1000 de crésol ou d'acide phénique et on répartit en tubes.

c) *Méthode de Widal et Salimbeni.* — Des cultures de bacilles T, A et B, sélectionnés d'après leur pouvoir antigène, sont émulsionnées dans l'eau physiologique après 18 heures d'étuve. On les stérilise pendant une heure dans un appareil à agitation continue à 57° pour le para B, à 56° pour le bacille typhique et le para A. L'émulsion renferme finalement, par centimètre cube, 4 200 millions de germes dont 3/7 de T, 2/7 de para A, et 2/7 de para B.

On pratique soit une seule inoculation de 1,5 centimètre cube, soit deux inoculations de 1 et 2 centimètres cubes.

d) *Méthode de Vincent.* — Les cultures sur gélose, âgées de 24 heures, de dix souches de T, cinq de A et cinq de B sont émulsionnées dans l'eau physiologique stérile, puis diluées aux proportions voulues. On additionne ensuite le liquide d'éther, on agite et on laisse à la glacière pendant 24 heures. On évapore alors l'éther en portant le liquide dans un flacon large, à demi rempli, et simplement bouché à l'ouate et plongeant dans un cristallisoir garni d'eau à 38°, sous la cloche à vide. L'éther est ainsi évaporé rapidement. Le liquide vaccinal est finalement réparti aseptiquement en flacons stériles qu'on scelle à la lampe. Il est titré à raison de 2.500 millions de bacilles par centimètre cube, soit 1/2 T,

1/4 A et 1/4 B. On doit le conserver en glacière à l'obscurité et le rejeter après trois mois.

C'est sous cette forme que le laboratoire spécial du Val-de-Grâce le distribue pour l'armée française, où la vaccination antityphoïdique est obligatoire depuis 1914. On pratique actuellement une seule inoculation de 2 centimètres cubes, en arrière de l'épaule, à deux travers de doigt en dedans de l'acromion, *sous la peau.*

Au lieu de tuer les éléments microbiens par l'éther, on peut les stériliser très efficacement, sans endommager leur protoplasme, par le *chlorure d'éthyle,* comme l'a fait A. Berthelot pour le *Proteus.*

Pour stériliser par le chlorure d'éthyle une émulsion microbienne, on abaisse la température de celle-ci au voisinage de 0° en plaçant le tube qui la renferme dans de la glace concassée; puis on y introduit, par 10 centimètres cubes d'émulsion, *un* ou *deux centimètres cubes* de chlorure d'éthyle liquide, en se servant pour cela du jet capillaire produit par les petits tubes qu'on utilise pour l'anesthésie locale. On agite doucement le mélange des deux liquides et l'on place le tube debout dans une bouteille Thermos contenant de la glace pilée. On l'y laisse 24 ou 48 heures.

Pour se débarrasser rapidement du chlorure d'éthyle, il suffit de plonger quelque temps dans un bain d'eau tiède, à 38°, le tube qui contient l'émulsion stérilisée.

Cette méthode est applicable à la préparation de divers vaccins microbiens.

e) *Méthode de Pfeiffer et Kolle.* — Des cultures sur gélose de 24 heures sont émulsionnées dans l'eau salée physiologique, chauffées à 60° pendant une heure et demie à deux heures, additionnées de 3 p. 1.000 d'acide phénique, réparties en flacons scellés à la lampe et chauffées de nouveau à 60° pendant 30 minutes Chaque centimètre cube d'émulsion contient environ 4 milligrammes de microbes.

f) *Virus vivants vaccinants.* — *Castellani* a employé comme vaccin, en injections sous-cutanées, des cultures chauffées 1 heure à 50°.

Ch. Nicolle, Conor et *E. Conseil* ont proposé l'injection intraveineuse de bacilles typhiques provenant de cultures sur milieux gélosés, bien lavés par plusieurs centrifugations

successives avec de l'eau physiologique, puis chauffées seulement pendant 25 minutes à 46°, température insuffisante pour les tuer. On fait une première injection de 400 millions de bacilles et, 2 semaines après, une seconde de 1 milliard 200 millions.

g) *Autolysats.* — *Conradi*, *Bassenge* et *Mayer* ont utilisé comme vaccins les produits d'autolyse directe des bacilles typhiques dans l'eau distillée. Les bacilles, recueillis sur gélose après 24 heures de culture, sont simplement mis en suspension dans de l'eau distillée et rigoureusement agités par intermittence pendant trois jours. On filtre ensuite sur bougie Berkefeld ou mieux sur papier Chardin mouillé.

Mac Fadyen et *Rowland* ont employé un filtrat de bacilles congelés d'abord par l'air liquide, puis décongelés.

h) *Méthode de Ranque et Senez, vaccins iodés.* — Une dilution de cultures de 18 heures sur gélose, de concentration telle qu'un centimètre cube contienne environ 500 millions de bacilles, est additionnée de 1 p. 100 de solution aqueuse iodo-iodurée décinormale du Codex. On laisse agir l'iode pendant 30 minutes et on arrête ensuite son action par addition d'une solution d'hyposulfite de soude stérilisée, jusqu'à décoloration totale. On laisse ensuite au repos pendant 15 à 20 jours. Les bacilles morts se déposent. On décante le liquide surnageant qu'on remplace par un volume d'eau salée physiologique correspondant au volume initial de la dilution de culture. Le vaccin est réparti en ampoules et prêt à servir.

i) *Lipo-vaccin de Le Moignic, Pinoy et Sézary.* — On émulsionne les cultures sur gélose après 19 heures d'étuve, dans l'eau physiologique stérile. Après centrifugation, le culot est additionné d'une préparation huileuse spéciale et stérilisé par chauffage à 57° pour T et à 60° pour A et B avec addition d'eugénol. On dilue ensuite le tout dans un mélange huileux définitif qui renferme, par centimètre cube, 2 milligrammes de T, 1,75 milligramme de A et autant de B. On pratique une seule inoculation de 1 centimètre cube.

*
* *

B. — Vaccins sensibilisés de Besredka.

Au lieu de tuer ou d'atténuer les cultures par un antiseptique ou par la chaleur, *Besredka* « *sensibilise* » les microbes avec un antisérum spécifique (antityphique, antipesteux, antidysentérique, anticholérique, etc.).

On racle des cultures sur gélose, on les émulsionne dans une petite quantité d'eau physiologique et on verse cette émulsion dans un tube contenant un volume au moins double de sérum sensibilisateur. Les microbes sont bientôt agglutinés. On les laisse en contact avec le sérum à la glacière pendant 48 heures. On centrifuge et on décante le sérum clair. Le dépôt de microbes est alors remis en suspension dans de l'eau salée physiologique, centrifugé de nouveau et lavé encore trois fois de la même manière pour enlever toute trace de sérum libre.

La masse microbienne est diluée dans une quantité d'eau salée physiologique telle que chaque centimètre cube contienne environ 500 millions de corps microbiens et répartie dans des tubes qu'on scelle à la lampe, sans addition d'antiseptique.

Sadakichi Ichikawa, au Japon, dit avoir obtenu des résultats excellents dans la thérapeutique de la fièvre typhoïde en sensibilisant les bacilles typhiques et les paratyphiques B par du sérum de convalescents. Il émulsionne 10 anses de culture dans 10 centimètres cubes de sérum de convalescent, laisse en contact 5 à 6 heures à l'étuve, en agitant fréquemment, centrifuge et lave trois fois les bacilles avec de l'eau salée physiologique stérile, puis reprend par 100 centimètres cubes d'eau salée physiologique phéniquée à 0,3 p. 100 et agite fortement pendant 1 heure.

Avant l'emploi, chaque ampoule de vaccin est agitée pour dissocier les grumeaux et aspirée dans une seringue contenant 0 cc. 5 environ d'eau salée physiologique tiède.

La dose de vaccin à injecter est de 0 cc. 3 à 0 cc. 6. *L'injection doit être faite dans les veines.* Elle est inefficace sous la peau. Elle produit, *chez les malades typhiques,* une élévation immédiate de température suivie d'un frisson et d'une chute brusque de la fièvre.

*
* *

C. — Vaccins mixtes.

Castellani a préparé des vaccins mixtes dont l'utilisation s'est montrée inoffensive et efficace dans de nombreux essais effectués sur l'homme dans l'Inde. Ils sont constitués par des émulsions de cultures sur gélose dans l'eau physiologique, additionnées de 0,5 p. 100 d'acide phénique pur et *non chauffées* (sauf pour le bacille typhique et les paratyphiques qui sont chauffés à 53° pendant 30 minutes). On en fait 2 injections à une semaine d'intervalle, l'une de 1 centimètre cube, l'autre de 2 centimètres cubes (1/2 et 1 centimètre cube pour les enfants et les femmes).

Le vaccin mixte *typhique, paratyphiques A et B* est titré à raison de 500 millions de bacilles typhiques et 250 millions de chacun des *para* par centimètre cube.

Le vaccin mixte *choléra + peste* est préparé avec des cultures de vibrions cholériques et de bacilles pesteux âgées de 3 jours, émulsionnées dans l'eau salée physiologique phéniquée à 0,5 p. 100, titrées chacune à 1 milliard de bacilles pesteux et 2 milliards de vibrions par centimètre cube, abandonnées pendant 24 heures à la température du laboratoire puis contrôlées par réensemencement pour garantir leur stérilité avant l'usage.

Le vaccin mixte *bacille typhique + paratyphiques A* et *B + peste + choléra* est préparé de la même manière, mais les cultures de typhique et de paratyphiques, âgées seulement de 24 heures, sont chauffées à 53°, après avoir été émulsionnées dans l'eau salée physiologique phéniquée à 0,5 p. 100.

Le vaccin mixte *bacille typhique + paratyphiques A* et *B + M. melitensis* contient une émulsion de culture de mélitensis sur gélose âgée de 3 jours, non chauffée, titrée à 1 milliard de germes par centimètre cube. Les quatre espèces de microbes sont mélangées en parties égales. La dose à injecter est de 0 cc. 5 à 0 cc. 6 pour la première inoculation et de 1 centimètre cube à 1 cc. 2 pour la deuxième.

Le sérum des sujets injectés avec ces vaccins mixtes est agglutinant après 2 à 3 semaines pour chaque microbe, au même taux que s'ils avaient été traités par un seul microbe-vaccin isolément.

*
* *

D. — Méthode de Sabouraud pour la préparation des vaccins staphylococciques.

Des cultures sur gélose-peptone glycérinée acétique (milieu de Sabouraud déjà indiqué) sont, après 48 heures de séjour à l'étuve à 37°, délayées dans de l'eau salée physiologique (environ 10 centimètres cubes par tube). L'émulsion est aspirée à la pipette et portée dans des tubes à centrifuger stériles. On centrifuge, on décante le liquide clair. Le culot, repris par 3 ou 4 centimètres cubes d'eau salée, est reporté à la centrifuge, mais cette fois dans un petit tube soigneusement taré avant l'introduction de l'émulsion microbienne. On centrifuge, on enlève toute l'eau que la pipette peut aspirer, puis on pèse de nouveau le tube à la balance de précision L'expérience montre que le culot contient environ 500 millions de cocci par milligramme.

Les microbes sont délayés dans de l'eau physiologique stérile à raison de 5 centimètres cubes de celle-ci pour 1 centigramme de dépôt. Chaque centimètre cube contient donc environ 1 milliard de cocci.

L'émulsion, ainsi faite au taux voulu, est portée dans un flacon bouché à l'émeri, stérile, et additionnée de son volume d'éther. On la conserve à la glacière pendant 24 heures et on l'agite de temps en temps.

On décante ensuite l'éther et on évapore ce qui en reste en portant le flacon immergé dans un cristallisoir contenant de l'eau tiède à 38°, sous une cloche à vide.

Le vaccin est alors réparti en ampoules qu'on scelle à la lampe et qu'on chauffe finalement pendant une heure dans un bain-marie à 60°. Il est ainsi prêt à servir et se conserve longtemps.

*
* *

E. — Méthode de Ch. Nicolle et Blaizot.

Appliquée d'abord à la préparation d'un vaccin mixte antigono et antisynococcique (voir chap. XXXI), cette méthode

a été adaptée par *Ch. Nicolle* et *Blaizot* à d'autres microbes (staphylocoque, coqueluche, etc.).

Elle consiste à émulsionner les cultures sur milieux solides, raclées puis lavées par plusieurs centrifugations successives, non plus dans l'eau salée physiologique, mais dans une solution à 7 p. 1.000 de fluorure de sodium. La vitalité des microbes, et aussi leur toxicité, sont ainsi supprimées sans que le protoplasma soit altéré. Ils ne s'autolysent plus et conservent cependant toutes leurs propriétés antigènes.

Après 24 heures ou 48 heures de culture sur milieux appropriés, les microbes sont émulsionnés dans la solution de fluorure, puis centrifugés et lavés plusieurs fois dans cette même solution en vue d'éliminer toutes les substances toxiques (peptone, etc.) provenant des milieux nutritifs. L'émulsion finale est portée à la glacière où on la laisse pendant 48 heures à trois jours, puis on la titre par addition d'eau fluorée de telle sorte qu'elle renferme 500 millions de microbes par centimètre cube. Au moment de l'employer, on dilue ce vaccin dans deux volumes d'eau salée physiologique afin d'éviter la sensation légèrement douloureuse que provoque l'introduction du liquide fluoré dans les tissus.

Les vaccins antistaphylococcique et anticoquelucheux fluorés, contenant 250 millions de microbes par 1/2 centimètre cube (dose thérapeutique) sont chauffés 48 heures à 40°. On les emploie en injections intramusculaires tous les 2 ou 3 jours.

*
* *

F. — Méthode de Wright pour la numération des germes contenus dans un vaccin microbien.

Cette méthode consiste à mélanger 1 centimètre cube d'émulsion vaccinale (faite dans l'eau salée physiologique) colorée par une goutte de solution aqueuse à 1 p. 100 de bleu de méthylène, avec un égal volume de sang humain (dont on a déterminé, au préalable, la richesse en globules rouges [1]) et avec 3 centimètres cubes d'eau salée physiologique.

1. La teneur normale du sang humain en hématies est de 5 milliards par centimètre cube.

On prélève une goutte de ce mélange qu'on étale sur une lame porte-objet et qu'on laisse sécher. Les microbes apparaissent légèrement teintés en bleu parmi les hématies.

Dans plusieurs champs du microscope pourvu d'un oculaire micrométrique ou quadrillé, on compte, d'une part les hématies et, d'autre part, les éléments microbiens. Il ne reste plus qu'à établir le rapport des uns aux autres pour en déduire le nombre de microbes contenus, par exemple, dans 1 centimètre cube du vaccin.

Si on trouve une moyenne de 36 hématies et de 20 bacilles par champ microscopique, le rapport est :

$$\frac{36}{20} = \frac{5.000.000.000}{X}$$

X (représentant le nombre de bacilles contenus dans 1 centimètre cube de vaccin) = 2.800.000.000 par centimètre cube.

On peut aussi, comme le fait *M. Neisser*, mélanger avec une pipette à tétine de Wright, 1 volume de sang, 1 volume de solution de citrate de soude à 1,5 p. 100 et 1 volume d'émulsion vaccinale. On fait, avec ce mélange, des préparations sur lames, on sèche à l'étuve et on fixe dans le sublimé saturé, puis on lave à l'eau et on colore par la thionine phéniquée. On compte ensuite 500 hématies dans un certain nombre de champs et les microbes qui se trouvent dans les mêmes champs. Supposons qu'on en ait trouvé 670. On établit alors la proportion suivante :

$$X = \frac{670 \times 5.000.000.000}{500} = 6.700\ 000.000 \text{ de microbes par cc.}$$

Dans la pratique courante, la méthode de titrage par pesée de *Sabouraud* ci-dessus décrite (D) est beaucoup plus expéditive et donne des résultats suffisamment précis.

*
* *

G. — Méthode de numération à l'hématimètre (Salimbeni).

Employer l'hématimètre Thomas-Zeiss dont chaque carré correspond à 1/4000e de millimètre cube. Faire des dilutions de plus en plus étendues de l'émulsion microbienne avec de l'eau formolée au 1/100, légèrement

colorée par la fuchsine, de façon à obtenir un maximum de 10 germes par petit carré de l'hématimètre. On note le titre de la dilution, on prend la moyenne des germes contenus dans un petit carré et on multiplie par 20 millions. Ce chiffre de 20 millions correspond, pour le modèle d'hématimètre précédent, à la quantité de germes contenus dans 1 centimètre cube lorsque chaque petit carré en contient 1. En tenant compte du taux de la dilution employée, il sera facile de calculer la teneur en germes de l'émulsion mère et de la ramener ensuite au titre convenable en la diluant.

*
* *

H. — **Numération des germes par mesure de l'opalescence des émulsions.**

On peut également préparer, pour un microbe donné, des émulsions-tests contenant un nombre déterminé de germes qui serviront à étalonner les émulsions de la même espèce microbienne en comparant leur degré d'opalescence. Les différences d'opalescence entre deux émulsions restent appréciables lorsque la différence du nombre des germes est supérieure à 25 millions au centimètre cube. Quand le titre microbien des émulsions est supérieur à 400 millions de germes au centimètre cube, leur opacité est trop intense pour que d'aussi faibles différences apparaissent avec netteté.

Il est indiqué de préparer une série d'émulsions-tests en eau formolée à 0,5 pour 100 contenant de 50 à 400 millions de germes par centimètre cube et dont la concentration augmente de 50 millions par tube. On scelle les tubes à la lampe et on les conserve à l'obscurité. Les tubes servant à comparer les émulsions vaccinales avec les émulsions-tests doivent être de même calibre et de même verre.

*
* *

I. — **Dosage des vaccins bactériens par le diaphanomètre de Léopold Robert (Stiassnie,** constructeur).

Léopold Robert a appliqué à la détermination du degre d'opalescence le principe de l'hémoglobinimètre de Gowers

et Sahli. Il a fait construire, à cette fin, par M. M. Stiassnie, un appareil : le diaphanomètre bactérien.

Ce diaphanomètre se compose de deux tubes de diamètres et de parois exactement semblables. Le tube A est gradué en quarts de centimètre cube de 0 centimètre cube à 15 centimètres cubes et coiffé d'un bouchon de caoutchouc qui en permet le renversement (il n'y a pas intérêt à descendre au delà de cette graduation en quarts de centimètre cube). Le tube B contient la suspension microbienne étalon qui va servir de point de comparaison. Il est scellé à la lampe et peut, par conséquent, être facilement agité. Il y a autant de tubes B que de variétés de vaccins. Les deux tubes sont supportés dans un montant en aluminium bruni dont la forme rappelle celle de l'hémoglobinimètre de Gowers et Sahli et qui a l'avantage de ne laisser passer les rayons lumineux qu'au travers des émulsions microbiennes, rendant ainsi la lecture très rapide.

Le principe consiste : 1° à faire, à l'aide des cultures, une suspension microbienne épaisse de volume connu ; 2° à prélever un volume également connu de cette suspension épaisse et à l'introduire dans le tube A ; 3° à amener par addition progressive du liquide de suspension (eau salée ou eau fluorurée) l'opalescence du tube A et du tube B à égalité.

Soit P le volume total de suspension microbienne épaisse, soit N le volume de cette émulsion sur laquelle on opère, soit R la quantité de liquide de suspension ajouté (R = le chiffre obtenu sur la graduation, diminué de N).

La quantité L du liquide de suspension à ajouter à l'émulsion microbienne épaisse totale pour obtenir un vaccin de même richesse que le tube étalon sera :

$$L = \frac{P \times R}{N}$$

J. — **Vaccins anticholériques.**

Pour la préparation des vaccins *anticholériques*, on peut admettre avec Kolle qu'une culture sur gélose inclinée en tube (ensemencée sur toute sa surface) fournit environ 20 milligrammes de vibrions. On délaye cette culture dans 10 centimètres cubes d'eau salée physiologique. Chaque centimètre cube correspond alors à 2 milligrammes de vibrions.

On chauffe cette dilution pendant 1 heure à 58° et on peut

y ajouter ensuite 3 pour 1.000 d'acide phénique. La dose vaccinale est, pour la première injection, 1 centimètre cube, pour la seconde (8 à 10 jours après), 2 centimètres cubes.

Pendant la grande guerre, afin d'obtenir un vaccin anticholérique aussi actif que possible en très grandes quantités, B. Fischer, L. Bitter et G. Wagner (de Munich) ont préparé leur milieu de culture tout simplement avec une décoction de 30 grammes de levure de brasserie dans 1.000 centimètres cubes d'eau de conduite, salée à 5 grammes par litre et solidifiée par 15 grammes pour 1.000 de gélose. Au lieu de tuer les vibrions par chauffage au bain-marie à 53°, ce qui est assez difficile à réaliser sur de grandes masses d'émulsions sans laisser des germes vivants, ces expérimentateurs stérilisent leurs cultures en ajoutant à l'émulsion faite en eau salée physiologique, pour chaque litre, 37 cc. 5 d'HCl normal. Ils agitent, laissent en contact 10 minutes, puis neutralisent avec 24 centimètres cubes de lessive normale de soude.

On constate, par l'expérimentation sur les animaux, que les vaccins ainsi préparés déterminent la formation d'anticorps aussi activement que ceux provenant de cultures tuées par chauffage. Chez l'homme ils ne provoquent pas de phénomènes réactionnels plus intenses.

*
* *

Le bacille dysentérique	doit être chauffé	1 heure	à 60°
— pesteux	—	—	65°
Les streptocoques	—	—	60°
Le pneumocoque	—	—	60°
Les staphylocoques	—	—	60°

Les « auto » ou « hétéro vaccins » microbiens destinés à l'usage thérapeutique sont généralement dilués et conservés dans une solution d'acide phénique à 0,5 p. 100 ou de lysol à 0,25 pour 100. Leur titrage est effectué de telle sorte que 1 centimètre cube renferme, d'après Wright :

Pour le staphylocoque.	100 à 500 millions
— streptocoque	5 à 19 —
— pneumocoque	5 à 10 —
— gonocoque	5 à 10 —
— acné	8 —
— vaccin mixte (acné et staphylocoque) 8 millions d'acné, 200 millions de staphylocoques.	
— bac. typhique, ...	1 à 2 milliards
— Bac. coli.	5 à 50 millions
— bac. tuberculeux 0 mgr. 002 et 0 mgr. 005 (émulsion bacillaire de Koch).	

*
* *

K. — Entéro-vaccins.

a) *Méthode de A. Lumière et J. Chevrotier.* — On inclut dans de petites capsules de kératine de grandes quantités de corps microbiens, d'abord débarrassés par des lavages et centrifugations successifs, des exotoxines produites dans les milieux de culture, tués ensuite par une heure de chauffage à 50°, puis desséchés et réduits en poudre.

L'enveloppe de kératine n'étant pas attaquée par le suc acide de l'estomac, mais seulement par le suc intestinal, les corps microbiens ne se trouvent mis en liberté que dans l'intestin grêle, de sorte que leurs chances d'absorption sont ainsi beaucoup accrues, d'autant que chaque capsule ou sphérule contient une assez grande quantité de microbes (300 millions de bacilles d'Eberth, 120 millions de paratyphiques et 180 millions de Bacterium coli).

Ingérée à la dose de 3 milliards de corps microbiens par kilogramme d'animal, en trois fractions, à 8 jours d'intervalle, cette préparation, d'après les auteurs, confère au lapin et au cobaye l'immunité contre l'infection expérimentale par une dose sûrement mortelle en 24 heures de bacilles d'Eberth ou de paratyphique.

b) *Méthode de Besredka.* — Des expériences effectuées sur le lapin ont conduit *Besredka* à user d'un artifice pour sensibiliser l'intestin de cet animal et faciliter ainsi l'absorption des bacilles tués par chauffage, en évitant, comme *A. Lumière et Chevrotier* en avaient eu les premiers l'idée, leur destruction dans l'estomac. Cet artifice consiste à utiliser la bile de bœuf stérilisée qu'on fait ingérer au lapin à la dose de 5 centimètres cubes, seule ou en mélange avec un peu de poudre de réglisse pour la rendre moins amère. Une ou deux ingestions de bile, quelques heures avant l'ingestion d'une quantité convenable de culture de bacilles tués par chauffage, suffisent à assurer l'absorption des microbes par la muqueuse intestinale et à réaliser l'immunité, même contre l'inoculation de virus dans les veines. Cette technique a été appliquée à la vaccination antidysentérique, antityphoïdique, anticholérique et antipesteuse.

CHAPITRE XLV

SÉRUMS ANTIMICROBIENS ET LEUR TITRAGE.

I. — **Mesure du pouvoir préventif et curatif.**

L'efficacité préventive ou thérapeutique des sérums antimicrobiens, tels que les sérums antistreptococcique, antipesteux, antipneumococcique, etc., ne peut être garantie que s'ils ont été préalablement éprouvés par l'expérimentation sur l'animal. Cependant la faible virulence du méningocoque pour les animaux de laboratoire ne permettant pas d'utiliser cette méthode, on la remplace par la mesure du pouvoir agglutinant du sérum antiméningococcique.

A. — *TITRAGE DU SÉRUM ANTISTREPTOCOCCIQUE.*

L'épreuve se fait par la souris et par le lapin.

On détermine, au préalable, pour chacun des types de streptocoques qu'on se propose d'étudier, d'abord s'il est virulent et ensuite quelle est la dose de culture susceptible de tuer, en 48 heures à trois jours, la souris par voie sous-cutanée, ou le lapin par voie intraveineuse.

Ceci fait, on cherche par des inoculations préventives de doses variables de sérum effectuées respectivement sous la peau ou dans les veines, quelle est la quantité de ce sérum qui suffit à préserver l'animal contre l'infection réalisée douze heures après avec une dose sûrement mortelle de culture.

En inoculant la culture d'abord, les doses variables de sérum douze heures après, on établit le pouvoir curatif du même sérum.

Le sérum antistreptococcique de l'Institut Pasteur est préventif pour la souris, à la dose de 1/40 à 1/400 de centimètre cube, contre une dose de virus susceptible de tuer, par inoculation sous-cutanée, environ 2.000 souris. Il est curatif à la dose de 0 cc. 001 lorsqu'on l'introduit

dans le péritoine d'une souris inoculée sous la peau depuis 18 à 24 heures avec une dose 10 fois mortelle de virus.

Chez le lapin, on empêche la mort de l'animal inoculé sous la peau avec 100 doses mortelles en lui injectant dans les veines, deux heures après l'injection, 1 cc. 5 à 2 centimètres cubes de sérum.

B. — *TITRAGE DU SÉRUM ANTIPESTEUX*

1/10 centimètre cube injecté sous la peau ou dans le péritoine d'une souris, 24 heures avant ou 16 heures après infection de cet animal par simple piqûre avec une aiguille trempée dans une culture virulente de bacille de la peste, doit suffire à empêcher la mort. En Allemagne, on préfère se servir du rat. On injecte le sérum à essayer dans le péritoine et l'infection est réalisée par piqûre avec une aiguille creuse, à la base de la queue.

C. — *TITRAGE DU SÉRUM ANTIPNEUMOCOCCIQUE*

a) *Méthode américaine* (Etat de New-York). *Sérum étalon.* — Son efficacité est telle que, injecté à la dose de 0 cc. 2 à une souris de 16 à 22 grammes, il l'immunise pendant 4 jours au minimum contre 0 cc. 1 de culture étalon de pneumocoques du type I dont 0 cc. 000001 tue la souris témoin en moins de 48 heures.

Technique du titrage. — La dilution de la culture et du sérum sera faite en bouillon préparé avant l'épreuve expérimentale, de telle façon qu'il ne soit pas mesuré moins de 0 cc. 5 de cette dilution. Ainsi 2 centimètres cubes de sérum sont dilués dans 3 centimètres cubes de bouillon, de sorte que 0 cc. 5 du mélange contienne 0 cc. 2 de sérum. De même on ajoute 1 centimètre cube de culture à 4 centimètres cubes de bouillon, de sorte que 0 cc. 5 du mélange contienne 0 cc. 1 de culture.

Dans la préparation de l'injection, 0 cc. 5 de la culture diluée et 0 cc. 5 de sérum dilué sont intimement mélangés dans le tube de la seringue et injectés en 2 minutes dans le péritoine d'une souris pesant 16 à 22 grammes. On procède en même temps à des épreuves de contrôle avec le

sérum étalon et à des épreuves de contrôle de la virulence de la culture sans sérum.

Le titre protecteur du sérum vis-à-vis de la culture constitue son degré d'efficacité et doit au moins égaler celui du sérum étalon.

b) *Méthode de Nicolle-Cotoni-Truche et Raphaël.* — On injecte, sous la peau de la souris, 1/10 de centimètre cube du sérum à titrer et, le lendemain, 1/100 de centimètre cube de culture tuant les souris témoins au millionième de centimètre cube. Si l'animal qui a reçu le sérum résiste, le sérum est considéré comme bon. Il convient d'éprouver les animaux-sérum avec diverses races de pneumocoques.

Un sérum provenant d'un animal hyperimmunisé avec un type donné de pneumocoques peut être très actif sur des pneumocoques tout différents par leur agglutinabilité. C'est ainsi que :

1° Les pneumocoques du type I fournissent des sérums qui peuvent protéger la souris contre l'inoculation de 10.000 doses mortelles de pneumocoques I et contre l'inoculation de 100, 1.000, ou 10.000 doses mortelles des pneumocoques II et III. Ils sont peu actifs sur les pneumocoques IV.

2° Les pneumocoques II fournissent des sérums qui protègent la souris contre 1.000 quelquefois 10.000 doses mortelles de germes homologues et contre 1.000 doses mortelles de pneumocoque III. Ils sont peu actifs sur les pneumocoques I et IV.

3° Certains sérums d'animaux préparés avec le pneumocoque III protègent contre 1.000, quelquefois 10.000 doses mortelles de germes homologues et contre 1.000 doses mortelles d'un pneumocoque I. Ils sont très peu actifs sur les pneumocoques II et IV.

4° Les pneumocoques IV fournissent des sérums qui protègent la souris contre 100 doses mortelles de germes homologues. Leur activité à l'égard des pneumocoques I, II et III est en général peu marquée.

La conférence internationale de Sérologie (Paris, 1922) estime que le titrage du sérum chez la souris, avec l'emploi d'un sérum étalon comme contrôle, constitue une base suffisante pour la standardisation internationale des sérums.

On peut ainsi effectuer ce titrage chez la souris, soit en injectant dans le péritoine une quantité fixe : 0 cc. 2 de sérum mélangé à des quantités de culture très virulente en bouillon, variant de 0 cc. 1 à 0 cc. 4 ou plus, soit en injectant dans le péritoine des quantités variables plus faibles : 0 cc. 001 à 0 cc. 0001 de sérum et, trois heures après, une quantité moyenne de culture, par exemple, 0 cc. 0001. La culture devra tuer la souris à la dose minimum de 0 cc. 0000001. Pour chaque titrage, on devra utiliser un sérum étalon.

D. — *TITRAGE DU SÉRUM ANTIMÉNINGOCOCCIQUE*

a) *Méthode américaine.* — (Etat de New-York.) Le sérum antiméningococcique doit agglutiner aux dilutions de 1/5.000, 1/2.000, 1/3.000 et 1/1.500 les quatre cultures types de méningocoques A, B, C, D, respectivement, en employant une émulsion d'opacité type et en maintenant les tubes à 55° centigrades, pendant une durée de 16 à 24 heures.

Emulsions microbiennes types. — Leur opacité doit correspondre à une émulsion de sulfate de baryum contenant 3 centimètres cubes de solution à 1 pour 100 de chlorure de baryum et 79 centimètres cubes de solution à 1 pour 100 d'acide sulfurique. Ce type d'émulsion méningococcique contient approximativement 2.000 millions de germes par centimètre cube.

Technique du titrage. — La dilution sera faite avec une solution saline normale à 8,5 pour 100 de NaCl. Après addition de sérum, le mélange doit contenir environ 1.000 millions de bacilles. Les émulsions de cultures types seront ajoutées, dans des tubes à agglutination de 8 à 11 millimètres de diamètre, au sérum dilué à titrer ainsi qu'aux dilutions correspondantes du sérum étalon. On porte au bain-marie à 65° pendant 16 à 24 heures. Le titre ainsi déterminé est représenté par la dilution maximum du sérum avec laquelle l'agglutination finale des méningocoques peut être aisément reconnue à l'œil nu. Le pouvoir agglutinant enregistré donne l'efficacité du sérum.

b) *Méthode de M. Nicolle, E. Debains et C. Jouan.* —

On émulsionne les germes dans la solution physiologique (10 pour 1000 de NaCl), à raison de 1 centigramme de microbes pour 20 centimètres cubes de la solution. Les cultures jeunes, âgées de 24 heures ou moins, conviennent seules.

On prépare quatre séries de tubes contenant tous 1 centimètre cube d'émulsion d'un des types A, B, C, D, de méningocoques et l'on verse respectivement, pour chaque groupe, des quantités croissantes de sérum 1/20, 1/50, 1/100, 1/200, etc... On abandonne pendant 24 heures à la température ordinaire et on examine ensuite à la loupe.

Nota. — Les sérums antimicrobiens qui s'adressent aux maladies *septicémiques* ne sont efficaces, d'une manière générale, au point de vue *thérapeutique*, que lorsqu'on les injecte à doses élevées et par voie intraveineuse. Lorsque celle-ci ne peut pas être choisie, il faut employer la voie péritonéale.

E. — *TITRAGE DES ANTICORPS OU SENSIBILISATRICES DES SÉRUMS ANTIMICROBIENS*

Le rôle des sensibilisatrices ou anticorps que renferment en plus ou moins grande quantité les sérums antimicrobiens n'est pas encore très exactement établi. Quelques-unes de ces sensibilisatrices, « les anticorps tuberculeux » par exemple, apparaissent plutôt à certaines périodes de la maladie comme des témoins de l'infection bacillaire, mais ne semblent pas remplir de fonctions défensives. Quoiqu'il en soit, dans beaucoup d'infections, la richesse du sérum en sensibilisatrices paraît d'autant plus grande que la défense de l'organisme est plus active. Il y a donc intérêt à provoquer la formation de ces sensibilisatrices (c'est le but des vaccins microbiens) et à pouvoir en mesurer la quantité existant dans les humeurs.

Cette mesure se fait par la réaction de fixation de Bordet-Gengou en prenant comme antigène le microbe (ou parfois ses produits de macération ou de sécrétion) et comme source d'anticorps, le sérum dans lequel il s'agit de les titrer. On établit ainsi, pour chaque échantillon de sérum, sa valeur en unités d'anticorps par centimètre cube.

CHAPITRE XLVI

MÉTHODES DE TITRAGE DES TOXINES ET DES SÉRUMS ANTITOXIQUES.

I. — SÉRUM ANTIDIPHTÉRIQUE

A. — **Titrage d'un sérum antidiphtérique en unités antitoxiques.**

On doit avoir à sa disposition :

1° Un sérum-étalon (par exemple celui que fournit l'Institut Pasteur de Paris ou l'Institut de Médecine expérimentale de Francfort-sur-Mein, en solution glycérinée et titrée) ;

2° Une toxine d'épreuve dont on a préalablement déterminé, par injection sous-cutanée à des cobayes du poids de 250 à 300 grammes, la dose minima mortelle en 4 à 5 jours. Cette dose doit être voisine de 0 cc. 005 ou 1/200 de centimètre cube ;

3° De l'eau salée physiologique à 8 gr. 5 de NaCl par litre pour les dilutions ;

4° Une série de pipettes (au moins 2) de 1 centimètre cube graduées en centièmes de centimètre cube, entre deux traits ;

5° Des pipettes de 1 et de 2 centimètres cubes graduées par 1/10 de centimètre cube ;

6° Une série de petits verres coniques à expériences, de 15 centimètres cubes, recouverts de capuchons de papier-filtre et stérilisés à sec ;

7° Des seringues stérilisables de 1 et de 5 centimètres cubes ;

8° Un certain nombre de jeunes cobayes du poids de 250 à 300 grammes (maximum) ;

9° Enfin le sérum antidiphtérique dont il s'agit d'effectuer le titrage. Ce sérum doit avoir été préalablement chauffé au bain-marie une heure à 58°.

a) *Sérum étalon.* — Les solutions glycérinées de sérum-étalon contiennent généralement 10 unités antitoxiques par centimètre cube (leur titre est d'ailleurs indiqué sur l'étiquette).

On en prend 1 centimètre cube qu'on dilue dans 9 centimètres cubes (ou dans x centimètres cubes d'eau salée physiologique, de telle sorte que *chaque centimètre cube de dilution corresponde à une unité antitoxique* ou *UA* (ou *IE* Immunitäts-Einheit d'Erlich).

Cette *unité* neutralise exactement *in vitro 100* doses minima mortelles de toxine.

b) *Toxine d'épreuve.* — Il faut avoir une toxine dont on a déterminé par plusieurs expériences la dose minima mortelle en 4 ou 5 jours par injection sous-cutanée aux cobayes de 250 à 300 grammes.

Cette toxine doit être vieille d'au moins deux mois et avoir été conservée à la glacière, sous une couche de toluol, dans un flacon bien bouché. Elle est alors suffisamment stable et le même échantillon peut servir à un grand nombre de titrages.

Si l'on n'a pas de bonne toxine à sa disposition, on peut se procurer de la toxine d'épreuve (standardtoxine), toute titrée, à l'Institut Pasteur de Paris ou au laboratoire de Francfort.

En possession de cette toxine, dont nous supposons la dose minima mortelle *DMM* = 0 cc. 004, il s'agit de déterminer d'abord la dose qui est exactement neutralisée par *1 UA* (1 unité antitoxique de sérum-étalon). Cette dose est appelée *Lo*. Pour la préciser, on fait, dans une série de verres coniques, des mélanges de toxine à doses croissantes à partir de 100 fois la dose minima mortelle (soit pour notre toxine dont la *DMM* est 0 cc. 004 $\times$ 100 = 0 cc. 4) avec 1 centimètre cube de dilution de sérum-étalon contenant *1 UA* [1]. On complète dans tous les vases au même volume, soit 3 centimètres cubes, avec de l'eau physiologique. On laisse en contact pendant 30 minutes à la température du laboratoire et on injecte successivement chaque mélange à un cobaye du poids de 250 à 300 grammes, sous la peau du ventre, près de la racine de la cuisse, — avec la même

1. Voir appendice à la fin du volume (tables de dilution).

seringue, en commençant par le mélange le plus faible en toxine.

Voici le schéma d'une expérience type :

Numéro des verres	Mélanges		Résultats de l'inoculation
1	1 UA + 0cc. 46 toxine + 1 cc. 54 H^2O Phys.	30 minutes de repos après mélange à la température du laboratoire	Pas d'œdème au 4e jour survie
2	1 UA + 0cc. 47 toxine + 1 cc. 53 —		Léger œdème, survie
3	1 UA + 0cc. 48 toxine + 1 cc. 52 —		Œdème, paralysie, survie
4	1 UA + 0cc. 49 toxine + 1 cc. 51 —		Fort œdème + mort le 8e jour
5	1 UA + 0cc. 50 toxine + 1 cc. 50 —		+ mort le 5e jour
6	1 UA + 0cc. 51 toxine + 1 cc. 49 —		+ mort en 3 jours.

La dose Lo pour cette expérience est donc 0 cc. 46 de toxine puisque le mélange de cette dose avec 1 UA de sérum étalon ne donne pas d'œdème local au quatrième jour.

Il s'agit maintenant de déterminer la dose L + c'est-à-dire la dose de toxine qu'il faut ajouter à Lo pour tuer en 4 à 5 jours les cobayes de 250 à 300 grammes. Il semble que cette dose L + doive être la dose Lo + 1 dose minima-mortelle (0 cc. 004). En fait, il résulte des travaux d'Ehrlich sur les *toxones* et les *toxoïdes* qu'elle est toujours supérieure et qu'elle varie, suivant les toxines, de 0,5 à 28 doses minima mortelles.

Pour la déterminer, on fait dans une autre série de verres coniques, et dans les mêmes conditions que précédemment, des mélanges de 1 centimètre cube de dilution de sérum contenant une unité antitoxique et de quantités de toxine graduellement un peu plus fortes que la dose Lo, soit par exemple :

Numéro des verres	Mélanges		Résultats de l'inoculation
1	1 UA + 0cc. 47 toxine + 1 cc. 54 H^2O Phys. pour compléter à 3 cc.	20 minutes de repos après mélange à la température du laboratoire	Pas d'œdème, survie
2	1 UA + 0cc. 48 toxine + 1 cc. 52 —		Pas d'œdème, survie
3	1 UA + 0cc. 49 toxine + 1 cc. 51 —		Léger œdème, survie
4	1 UA + 0cc. 50 toxine + 1 cc. 50 —		Fort œdème + mort le 9e jour
5	1 UA + 0cc. 51 toxine + 1 cc. 49 —		+ mort le 5e jour
6	1 UA + 0cc. 52 toxine + 1 cc. 48 —		+ mort en 48 heures

Dans cette expérience, la dose L + de toxine d'épreuve est donc 0 cc. 51, soit la dose Lo (0 cc. 46) + 0 cc. 004 (DMM) × 13, c'est-à-dire qu'elle correspond à la dose Lo + 13 doses minima mortelles.

C'est cette dose Lo + 0 cc. 51 ou L +, qui va désormais servir pour effectuer le titrage du sérum antidiphtérique dont il s'agit d'établir la valeur antitoxique.

c) *Titrage du sérum.* — Pour cela, on prépare d'abord des dilutions de ce sérum au 1/10, 1/100, 1/200, 1/300, etc., en eau salée physiologique.

Dans un premier tube à essai contenant exactement 9 centimètres cubes d'eau salée physiologique stérile, on introduit 1 centimètre cube du sérum à titrer et on agite violemment pour faire un mélange bien homogène. C'est la dilution I.

1 centimètre cube de cette dilution I correspond à 1/10 centimètre cube du sérum initial.

Dans un second tube à essai contenant 9 centimètres cubes d'eau salée, on introduit 1 centimètre cube de la dilution I et on agite de nouveau avec soin. Cette dilution II, dont 1 centimètre cube correspond à 1/100 du sérum initial, sert à faire les dilutions successives auxquelles il s'agit d'ajouter la dose L + de toxine (0 cc. 51) puis de l'eau salée physiologique pour compléter au volume de 3 centimètres cubes dans tous les verres. Après 30 minutes de repos à la

température du laboratoire, chacun de ces mélanges est inoculé à un cobaye de 250 à 300 grammes.

On trouvera plus loin, en appendice, des tables de dilution qui permettront d'effectuer très commodément et avec toute la précision désirable les divers titrages.

Un sérum titre au moins 350 unités par exemple, si, lorsque après avoir dilué 1 centimètre cube de ce sérum dans 349 centimètres cubes d'eau salée physiologique et pris 1 centimètre cube de cette dilution, cette dose de 1 centimètre cube mélangée à la dose L + de toxine, ne tue pas en moins de 4 jours le cobaye auquel on injecte le mélange.

Un autre sérum titrerait au moins 500 unités, si, lorsque après avoir dilué 1 centimètre cube de ce sérum dans 499 centimètres cubes d'eau salée physiologique et mélangé 1 centimètre cube de cette dilution à la dose L + de toxine, le mélange injecté sous la peau se montre inoffensif pour le cobaye du poids de 250 à 300 grammes.

Le sérum antidiphtérique normal délivré par l'Institut Pasteur de Paris titre en moyenne 250 à 300 unités par centimètre cube. Mais l'Institut Pasteur prépare aussi, par un nouveau procédé étudié par Ramon, des sérums concentrés titrant 1.000 unités par centimètre cube.

*
* *

B. — **Mesure de la valeur préventive d'un sérum antidiphtérique.**

Le pouvoir préventif d'un sérum est indiqué par la quantité de ce sérum qu'il faut injecter à un cobaye pesant x grammes pour le préserver contre l'intoxication par une dose de culture ou de toxine mortelle en 36 ou 48 heures ; la culture ou la toxine ayant été injectée sous la peau de l'animal 24 heures *après* le sérum.

Si 0 cc. 01 du sérum à étudier, par exemple, suffit à préserver un cobaye du poids de 500 grammes contre *une dose* de culture ou de toxine *mortelle dans le délai sus-indiqué*, le sérum est préventif à 1 pour 50.000.

Si 0 cc. 005 d'un autre sérum exerce le même pouvoir

préventif sur un cobaye de 500 grammes, le sérum est préventif à 1 p. 300.000 et ainsi de suite, comme il est indiqué dans le tableau ci-après :

Dose du sérum	Poids du cobaye	Pouvoir préventif
0 cc. 1	500 gr.	1 p. 5.000
0 09	»	10.000
0,08	»	15.000
0,07	»	20.000
0,06	»	25.000
0,05	»	30.000
0 04	»	35.000
0,03	»	40.000
0,02	»	45.000
0,01	»	50.000
0,009	»	100.000
0,008	»	150.000
0 007	»	200.000
0,006	»	250.000
0,005	»	300.000
0,004	»	350.000
0 003	»	400.000
0,002	»	450.000
0,001	»	500.000

Ce qui revient à dire que 1 centimètre cube de sérum préserve 25.000, 50.000, 75.000 ou 100.000 grammes, etc., de cobaye contre la dose mortelle de culture ou de toxine.

*
* *

C. — Mesure du pouvoir curatif d'un sérum antidiphtérique.

Elle se fait par la même technique que la mesure du pouvoir préventif, mais en inoculant le sérum six heures après la dose mortelle de culture ou de toxine.

Les effets thérapeutiques d'un sérum varient considérablement suivant que ce sérum est introduit dans l'organisme par la voie *sous-cutanée* ou par la voie *intrapéritonéale* ou par la voie *intraveineuse*.

Pour le sérum antidiphtérique, s'il s'agit de neutraliser

in vivo la même dose de toxine *une heure*, par exemple, après l'inoculation de celle-ci, il faut en injecter, par voie intrapéritonéale, *80 à 90 fois plus*, ou, par voie sous-cutanée, *500 fois plus* que la dose qui suffit par voie intraveineuse. En d'autres termes les quantités en unités antitoxiques sont, dans ces conditions :

Par voie sous-cutanée	40 unités
— intrapéritonéale.	7 unités
— intraveineuse.	0.08

*
* *

D. — Détermination de la pureté bactériologique et chimique du sérum antidiphtérique.

(Voir ci-après, sérum antitétanique, II, C.)

II. — SÉRUM ANTITÉTANIQUE.

A. — Mesure du pouvoir préventif du sérum antitétanique.

On établit le plus simplement la valeur préventive d'un sérum antitétanique par la détermination de la quantité de sérum nécessaire pour immuniser 1 gramme de souris blanche contre une dose mortelle de toxine.

La toxine tétanique est habituellement d'une activité telle qu'il suffit d'en inoculer *un centième de milligramme* à une souris de 15 grammes pour la tuer en 4 jours. Un centimètre cube peut donc tuer 1.500.000 grammes de souris. On dit qu'une telle toxine a un pouvoir toxique de 1.500.000.

Il faut environ un cinq centième de centimètre cube (0 cc. 005), souvent beaucoup moins, pour tuer un cobaye de 500 grammes en 2 à 3 jours.

La dose minima mortelle en 2 à 3 jours pour une souris étant connue, on cherche quelle quantité de sérum il faut injecter *12 ou 24 heures avant cette dose minima mortelle* pour empêcher la mort.

On prend une série de souris pesant environ 15 grammes

et, à chacune d'elles, on injecte des doses progressivement croissantes de sérum convenablement dilué dans de l'eau physiologique stérile, de telle sorte que la quantité de liquide à injecter ne dépasse pas 1 centimètre cube.

Les sérums antitétaniques ont généralement une activité qui varie entre 10 millions et 1 milliard, c'est-à-dire qu'il suffit d'injecter un dix-millionième de sérum, parfois un milliardième, pour préserver 15 grammes de souris contre l'intoxication par la dose minima mortelle de toxine.

On fait donc les dilutions de telle sorte que la première souris reçoive, dans 1 centimètre cube de liquide, 0 cc. 000 000.1 de sérum, soit 1 centimètre cube de la VIIe dilution faite, en partant, pour la première, de 1 centimètre cube de sérum initial dans 9 centimètres cubes d'eau salée physiologique.

Une seconde souris reçoit une dose dix fois moindre, soit 1 centimètre cube de la VIIIe dilution, soit 0 cc. 000.000.01 de sérum. Et enfin une troisième souris reçoit une dose environ dix fois moindre, soit 1 centimètre cube d'une IXe dilution ou 0 cc. 000.000.001 de sérum.

Si la première et la seconde souris résistent ensuite à l'inoculation de la dose minima mortelle de toxine (0 cc. 000.01 par exemple), tandis que la troisième meurt après une période plus ou moins longue de paralysie, on dit que le sérum est actif au *cent millionième de centimètre cube*.

*
* *

B. — Titrage du sérum antitétanique en unités antitoxiques d'après la méthode américaine [1].

La méthode officiellement adoptée aux Etats-Unis (circulaire du 25 octobre 1902, n° 61, Treasury department) pour le titrage des sérums antitétaniques livrés au commerce est basée sur la définition suivante de l'unité antitoxique :

L'unité antitoxique représente dix fois la dose minima de sérum antitétanique nécessaire pour neutraliser in vitro une dose L + représentant 100 doses minima mortelles d'une toxine

1. Voir en appendice : tables de dilution.

d'épreuve stable dont la dose minima mortelle tue en 96 heures un cobaye de 350 grammes.

La toxine tétanique étant d'activité très variable et beaucoup moins stable que la toxine diphtérique, on a préparé en grande quantité une *standard-toxine*, poudre sèche, que l'on conserve à l'obscurité et au froid, dans le vide, et parfaitement déshydratée par l'acide phosphorique. Dans ces conditions, sa toxicité ne varie sensiblement pas en l'espace de deux années.

On l'obtient en précipitant la toxine liquide (filtrée) par le sulfate d'ammoniaque.

La dose L + *constante* de cette toxine représentant 100 doses minima mortelles est (calculée sur le poids sec) de 6 dixièmes de milligramme (0 gr. 0006).

Pour l'usage, on en dissout 0 gr. 1 dans 166 cc. 66 d'eau salée physiologique à 8,5 de NaCl pur par litre. Un centimètre cube de cette dilution contient exactement la dose L + c'est-à-dire 0 gr. 0006 (100 DMM).

On dilue ensuite le sérum à titrer et on en mélange des quantités progressivement croissantes à la même dose de toxine L +. Voici un schéma d'expérience à titre d'exemple :

N° des cobayes	Poids des cobayes	Injection sous-cutanée du mélange de		Résultats de l'inoculation
		Toxine dose L +	Sérum	
1	360	0,0006	0 cc. 001	mort en 2 jours 4 h.
2	350	»	0,0015	mort en 4 jours 1 h.
3	350	»	0,002	paralysie, survie
4	360	»	0,0025	légère paralysie, survie
5	350	»	0,003	aucun malaise, survie

Le cobaye n° 2 qui a reçu 0 cc. 0015 de sérum est mort en 97 heures. Aux termes de la définition de l'unité antitoxique, cette dose contient *un dixième d'unité 0,1*, donc 1 centimètre cube de ce même sérum titre 66 unités. C'est généralement la teneur du sérum antitétanique livré par l'Institut Pasteur de Paris, lorsqu'on le titre par la méthode américaine avec la *standard-toxine* préparée par le

laboratoire d'hygiène de Treasury Department (*Public Health and Marine Hospital service of the United States, Washington, D. C.*).

*
* *

C. — Titrage d'après la méthode allemande.

La méthode employée à l'*Institut de thérapeutique expérimentale de Francfort-sur-Mein* (chargé du contrôle des sérums allemands) repose sur l'emploi d'un sérum-étalon qu'on dilue de telle sorte que 1 centimètre cube renferme 1/100 d'unité immunisante (UI) et d'une toxine d'épreuve dont on a déterminé, au préalable, en se servant de la souris comme animal réactif, la dose Lo et la dose L + comme pour la toxine diphtérique.

Lorsqu'il s'agit de déterminer le titre antitoxique d'un sérum, on fait deux séries de 8 mélanges : la première série reçoit 1 centimètre cube de dilution de sérum-étalon (standard-sérum) correspondant à 1/100 *IU* ;

La deuxième série reçoit 1 centimètre cube de dilution du sérum à titrer.

A chaque série on ajoute la toxine d'épreuve aux doses intermédiaires entre Lo et L +.

On complète partout au volume de 4 centimètres cubes avec de l'eau salée physiologique ; on laisse en contact 30 minutes à l'abri de la lumière et à la température du laboratoire, puis on injecte deux séries de 8 souris, chaque souris recevant 0 cc. 4 de l'un des mélanges, sous la peau de la cuisse (donc 1/1000 UI + dose croissante de toxine d'épreuve).

Pour être accepté, le sérum doit contenir au moins 40 unités par centimètre cube.

*
* *

D. — Méthode française.

La technique très simple adoptée à l'Institut Pasteur de Paris est la suivante :

On commence par déterminer la dose minima mortelle

(en 4-5 jours) de toxine pour les cobayes de 250 à 300 grammes.

Cette dose, *multipliée par 100,* est la dose d'épreuve.

On prépare ensuite au moins trois dilutions du sérum à titrer : l'une à 1/1000, la seconde à 1/10.000, la troisième à 1/100.000.

Dans de petits verres coniques, on effectue soigneusement les mélanges de :

I 1 cc. de la dilution à 1/1.000 de sérum + 100 doses minima mortelles de toxine.
II 1 cc. de la dilution à 1/10.000 de sérum + 100 doses minima mortelles de toxine.
III 1 cc. de la dilution à 1/100.000 de sérum + 100 doses minima mortelles de toxine.
IV etc...

On complète partout à 4 centimètres cubes avec de l'eau physiologique ; on laisse les mélanges pendant 30 minutes à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière, puis on injecte la totalité de chacun d'eux dans les muscles de la cuisse d'un cobaye. Il faut employer une seringue spéciale, stérile, pour chaque mélange.

Les sérums actifs à 1/10.000 sont considérés comme largement suffisants pour l'usage vétérinaire.

On réserve à l'usage humain ceux dont l'activité est de 1/100.000 et au-dessus.

*
* *

E. — Rapports entre les unités antitoxiques américaine, allemande et française.

La Conférence internationale de Sérologie tenue à Londres en 1921 a proposé d'établir une commune mesure de titrage du sérum antitétanique au moyen d'un sérum étalon en utilisant les procédés employés pour le dosage du sérum antidiphtérique. Il ressort des expériences comparatives effectuées dans les Instituts de Copenhague, Francfort, Paris, Rome et Washington que les rapports entre les différents sérums sont à peu près les suivants :

En considérant le sérum allemand comme titrant 1, le sérum américain titrerait 60 à 66 et le sérum français 2.500.

Pour obtenir un rapport plus simple, Kolle a suggéré l'idée de modifier l'unité allemande de manière que son rapport avec l'unité américaine soit de 1 : 50 et de multiplier cette unité par 100 pour l'adapter au titrage du sérum antidiphtérique. On aurait ainsi :

Unité américaine	Nouvelle unité allemande	Unité française
50	100	2.500

*
* *

F. — Détermination de la pureté bactériologique et chimique des sérums.

Les sérums préparés pour le commerce renferment parfois des impuretés qui seraient susceptibles d'en rendre l'usage dangereux si l'on n'apportait pas un soin suffisant à les éviter. Les infections d'origine microbienne sont faciles à déceler par le contrôle bactériologique. On effectue celui-ci, en ensemençant :

5 gouttes du sérum sur une plaque de gélose ;

2 gouttes dans un tube de bouillon ;

et quelques gouttes dans de la gélose glucosée, en profondeur (tubes de Veillon), pour la recherche des anaérobies. Tous ces ensemencements doivent rester stériles.

D'autre part, si le sérum renferme un antiseptique destiné à assurer sa conservation, il importe de s'assurer que la proportion de cet antiseptique n'est pas telle que le sérum en devienne toxique. Pour le vérifier, on injecte, sous la peau d'une souris du poids d'environ 15 grammes, 0 cc. 5 du sérum dont il s'agit. L'animal ne doit présenter aucun phénomène d'intoxication (une souris blanche pesant 15 grammes supporte au maximum 0 gr 0025 d'acide phénique, c'est-à-dire la quantité correspondant à une teneur de 0,5 p. 100 d'acide phénique ou de 0,4 p. 100 de tricrésol).

Enfin, il convient de s'assurer que le sérum ne renferme pas de toxine tétanique libre. Pour cela, on en injecte 10 centimètres cubes sous la peau du ventre d'un cobaye. Si l'animal reste parfaitement bien portant, le sérum, dont le pouvoir antitoxique ou préventif a été reconnu suffisant, offre toutes les garanties désirables.

*
* *

III. — VENINS ET SÉRUMS ANTIVENIMEUX

A. — Détermination du pouvoir neurotoxique d'un venin.

On détermine le pouvoir *neurotoxique* d'un venin par la méthode que voici :

On dissout 0 gr. 1 de venin sec, de *cobra* par exemple [1], dans 10 centimètres cubes d'eau salée physiologique. On fait, avec cette première solution qui correspond à 0 gr. 01 centigramme par centimètre cube, des dilutions successives à 1/1.000 et à 1/10.000.

On détermine alors la toxicité par gramme d'animal, par injection sous-cutanée.

La dose de venin de cobra mortelle en deux à six heures pour les souris pesant 15 grammes est ordinairement voisine de 0 gr. 000025.

Pour le cobaye, elle est d'environ 0 gr. 0005 (0,0002 par voie intraveineuse) et pour le lapin de 0 gr. 001 (0,0006 par voie intraveineuse), mais elle varie suivant l'origine, l'âge du venin et la manière dont il a été récolté et desséché, de sorte qu'il est nécessaire de faire un titrage pour chaque échantillon.

Le venin sec, conservé dans le vide, à l'abri de la lumière et au froid, garde pendant de longues années sa toxicité initiale.

En solution dans l'eau physiologique, même à l'abri de l'air et de la lumière, son atténuation est rapide. Il se conserve mieux en solution glycérinée à 50 p. 100. On peut alors le garder en petites provisions dans des pipettes scellées.

*
* *

B. — Détermination du pouvoir coagulant d'un venin de vipéridé vis-à-vis du sang, in vitro.

On rend le sang de cheval, de chèvre, ou de lapin incoa-

1. On trouve du venin sec de cobra chez *Poulenc* frères, 92, rue Vieille-du-Temple, à Paris.

gulable en le recueillant directement dans un flacon qui contient une solution concentrée de citrate de soude, par exemple, 10 centimètres cubes de sang dans 0 cc. 5 de solution de citrate à 20 p. 100. Le mélange est agité. (Cette dose de 1 p. 100 de citrate suffit pour empêcher la coagulation du sang ; la dose de 1 p. 150 ne suffit pas toujours).

Le sang citraté est ensuite réparti entre plusieurs tubes à essai qui en reçoivent chacun 1 centimètre cube.

On a préparé d'autre part une solution à 0,5 p. 100 de chlorure de calcium dont 0 cc. 2 suffisent à faire coaguler rapidement le sang citraté, tandis que 0 cc. 1 ne coagule que lentement et 0 cc. 05 pas du tout (mais ceci doit être vérifié pour chaque série d'expériences).

A une série de tubes contenant chacun 1 centimètre cube de sang citraté, on ajoute des quantités variables d'un venin de viperidé, par exemple de Lachesis : 0 mgr. 1, 0 mgr. 2, 0 mgr. 3, c'est-à-dire 0 cc. 1, 0 cc. 2, etc., d'une solution à 1 p. 1000. On note l'heure de chaque mélange. On ajoute ensuite à chaque tube 0 cc. 05 de chlorure de calcium (II gouttes de solution à 0,5 p. 100). On note l'heure de l'addition et on observe ensuite au bout de combien de temps, à la température du laboratoire, il se forme un caillot. Il ne doit pas s'en former du tout dans un tube témoin qui n'a reçu que le sang citraté et 0 cc. 05 de chlorure de calcium.

On fait plusieurs séries d'expériences :

1° En ajoutant en même temps le venin et la solution de chlorure de calcium ;

2° En ajoutant le venin au sang citraté quelques minutes (15' par exemple) avant le chlorure de calcium.

*
* *

C. — **Détermination du pouvoir hémolytique d'un venin** (voir *chap. XXVI*).

*
* *

D. — Détermination du pouvoir antitoxique d'un sérum antivenimeux.

Pour effectuer cette détermination, on opère le plus commodément par des mélanges *in vitro*.

Connaissant la dose mortelle en 2 à 6 heures, pour les souris blanches pesant 15 grammes par exemple, du venin dont on dispose, on répartit dans une série de petits verres coniques de 15 centimètres cubes de capacité, des quantités de sérum progressivement croissantes. On ajoute dans chaque verre la même dose mortelle de venin et on ramène partout au même volume par addition d'eau salée physiologique.

Après 30 minutes de repos à la température du laboratoire, on inocule chacun de ces mélanges à une souris, sous la peau du dos.

Il suffit ordinairement de 0 cc. 2 du sérum antivenimeux délivré par l'Institut Pasteur de Paris, pour neutraliser *in vitro* 0 gr. 0001 de venin de *cobra*.

On peut, conventionnellement, adopter comme *unité antitoxique* la dose de sérum qui neutralise *in vitro* dix doses minima mortelles de venin. Mais cette unité n'est pas la même pour les différentes espèces animales. Elle varie dans de larges limites, de la souris par exemple, au cobaye, au lapin et au chien.

*
* *

E. — Détermination du pouvoir préventif du sérum antivenimeux par l'inoculation intraveineuse au lapin.

C'est une expérience de cours qu'il est très facile d'effectuer et qui montre de la façon la plus saisissante l'action préventive immédiate du sérum antivenimeux contre l'intoxication par le venin de *cobra*.

On prend deux lapins de poids égal (1.800 grammes environ). A l'un d'eux (lapin A) on injecte, dans la veine marginale de l'oreille droite, 2 centimètres cubes de *sérum*

anticobra. On attend quelques minutes, puis dans la veine marginale de l'oreille gauche de ce même lapin A, on injecte 1 centimètre cube d'une solution de *venin* titrée à 1 milligramme par centimètre cube.

Immédiatement après, on injecte dans la veine marginale de l'oreille droite du second lapin B, qui sert de témoin, la même dose de 1 milligramme de *venin*.

On s'est assuré, par une expérience préalable, que cette dose de 1 milligramme, injectée par voie intraveineuse, tue un lapin de même poids en 20 à 30 minutes. Si un milligramme ne suffisait pas pour produire la mort dans ce délai, on augmenterait la dose, de telle sorte que celle-ci tue sûrement en 20 à 30 minutes. Le premier lapin A, immunisé par le sérum, reste bien portant et accepte volontiers de grignoter une carotte pendant que le lapin B meurt dans le délai indiqué.

*
* *

F. — Titrage des sérums antitoxiques par la précipitation.

Méthode de M. Nicolle, E. Césari et Debains. — Pour mesurer l'activité des sérums antitoxiques, on fait agir sur un volume constant de solution toxique concentrée, des volumes décroissants de sérum homologue.

Technique. — On sature par le sulfate de soude anhydre des filtrats de cultures diphtériques et tétaniques. On sèche les précipités obtenus (vide sulfurique) et on les réduit en poudre homogène. On dissout 0 gr. 8 de poudre dans 10 centimètre cube d'eau distillée. Le liquide résultant tue le cobaye de 550-650 grammes au 1/800 de centimètre cube sous la peau (poison diphtérique) ou au 1/12.000 dans le muscle (poison tétanique). On mélange à parties égales la solution toxique et une solution préalablement fondue à 40° de gélatine neutre, à 10 °/° dans l'eau physiologique. On répartit le mélange en tubes sous le volume de 1 centimètre cube et, après l'avoir solidifié à la glacière, on verse sur les culots 1 centimètre cube de sérum antitoxique de plus en plus dilué au 1/20, 1/50, 1/100.

1/200, etc... On abandonne pendant deux heures à la température du laboratoire et on lit. Tout résultat positif se traduit par l'apparition d'un disque blanc-bleuâtre au-dessus du sérum dilué et de la toxine-gélatine. Il importe que solution toxique et sérum soient absolument limpides.

Le sérum antidiphtérique de l'Institut Pasteur titrant 300 unités et le sérum antitétanique titrant 4.900 unités correspondent d'après la précédente technique à la formation d'un disque net pour 1 centimètre cube de sérum dilué au cinquantième.

TABLE DE CONCORDANCE

Précipitation obtenue avec 1 cc. de sérum dilué à		Nombre d'unités correspondant
S. antidiphtérique	1/25	200
	1/50	300
	1/75	400
	1/100	500
	1/125	600
S. antitétanique	1/10	2.000
	1/25	3.000
	1/50	4.000
	1/75	5.000
	1/100	6 000
	1/125	7.000
	1/150	8.000

*
* *

G. — Titrage des toxines diphtérique et tétanique (M. Nicolle, E. Césari et E. Debains).

On fait agir sur un volume constant de sérum très puissant (600 unités pour le sérum antidiphtérique et 9.000 pour le sérum antitétanique), des volumes décroissants de filtrats homologues tels quels.

Technique. — On ajoute au sérum salé à 3 p. 100, 0,3 de gélatine et on répartit en tubes à raison de 1 centimètre cube par tube. On fait prendre à la glacière, puis on verse doucement sur les culots 1 centimètre cube de filtrat de

plus en plus dilué à 9/10, 8/10..., 1/10. On abandonne pendant 2 heures à la température ambiante et on lit.

Les toxines utilisées dans l'immunisation des chevaux doivent tuer les cobayes de 350 grammes sous le volume minimum de 1/500 de centimètre cube pour la toxine diphtérique et 1/10.000 pour la toxine tétanique. Ces chiffres correspondent à la formation d'un disque net pour 1 centimètre cube de poison dilué à 1/2 ou 1/5 :

6/10 de cc. dans la méthode précédente correspondent à 1/100 de cc. pour la toxine diphtérique ; 5/10 correspondent à 1/150 ; 4/10 correspondent à 1/200 ; 3/10 correspondent à 1/250 ; 2/10 correspondent à 1/300 ; 1/10 correspond à 1/350.

*
* *

H. — Titrage de l'antitoxine par la floculation (méthode de *G. Ramon.*)

a) Floculation. — Dans une série de tubes à essai, on verse 20 centimètres cubes [1] d'une toxine diphtérique filtrée au 9e jour de culture et tuant en 4 jours un cobaye de 250 grammes, à la dose de 1/500 de centimètre cube, puis on ajoute des quantités décroissantes soit 1 cc. 5, 1 centimètre cube, 0 cc. 9, 0 cc. 8, 0 cc. 7, 0 cc. 6, 0 cc. 5, 0 cc. 4, etc., d'un sérum antidiphtérique frais, titrant 200 unités d'Ehrlich au centimètre cube et on mélange intimement en agitant. Une opalescence apparaît bientôt dans quelques-uns des tubes ; elle augmente rapidement et, au bout de quelques heures à la température ordinaire, elle fait place à une véritable floculation. Celle-ci est bien spécifique, elle n'est produite en présence de la toxine diphtérique ni par les autres antitoxines, ni par le sérum normal. La floculation des mélanges toxine antitoxine, n'apparaît pas dans tous les tubes après le même temps d'incubation. Le tube qui flocule en premier lieu correspond au mélange toxine antitoxine exactement neutralisé. Quant aux tubes qui floculent plus tardivement et qui contiennent des quantités immédiatement inférieures ou supérieures, ils sont, les premiers, de plus en plus toxiques, les seconds de plus en plus antitoxiques.

1. On peut évidemment employer un volume moindre de toxine, 5 ou même 2 centimètres cubes et des quantités proportionnelles de sérum.

b) Technique du dosage de l'antitoxine diphtérique par la floculation. — 1° *Détermination du pouvoir saturant de la toxine destinée aux dosages et établissement de la table de titrage correspondant à cette toxine.* — Dans des tubes à essai contenant, par exemple, 20 centimètres cubes de la toxine choisie en vue des dosages futurs, on ajoute des volumes décroissants : 2 centimètres cubes, 1 cc. 8, 1 cc. 6..., 1 cc., 0,9..., 0,3, 0,25, 0,2, 0,15, 0,1 du sérum étalon (dilution dans l'eau distillée d'un sérum étalon sec, conservé à l'abri de l'air et de la lumière). On agite, puis on laisse reposer à la température du laboratoire et on observe la floculation initiale. Supposons qu'avec le sérum étalon titrant 250 unités d'Ehrlich au centimètre cube, cette floculation apparaisse dans le tube contenant 20 centimètres cubes de toxine + 0 cc. 8 de sérum ; la floculation étant l'indice de la saturation, il faut donc, pour saturer 20 centimètrés cubes de toxine, 250 unités × 0,8 = 200 unités d'antitoxine. Par conséquent, un sérum qui floculerait en présence de cette même quantité de toxine, à la dose de 1 centimètre cube, titrerait 200 unités au centimètre cube ; un autre sérum qui ferait apparaître la floculation initiale avec 0 cc. 4 seulement serait plus riche en antitoxine, puisque d'après la floculation ces 0 cc. 4 contiendraient 200 unités ; il titrerait 200/0,4 = 500 unités au centimètre cube.

Pour une toxine donnée, on peut établir la table de titrage suivante :

Doses de sérum ajoutées à 20 cc. de toxine	Titre correspondant à chaque dose lorsqu'elle provoque la floculation initiale
2 cc.	100 unités
1,8	110 »
1,6	125 »
1,4	145 »
1,2	165 »
1	200 »
0,9	220 »
0,8	250 »
0,7	290 »
0,6	330 »
0,5	400 »
0,45.....	440 ».....
0,2 etc.	1.000 »

2° *Dosage d'un sérum antidiphtérique quelconque.* — On prépare comme précédemment, une série de tubes contenant 20 centimètres cubes de toxine et 2 centimètres cubes, 1 cc. 8..., 1 centimètre cube, 0 cc. 9, 0 cc. 8, 0 cc. 7, 0 cc. 6, etc., du sérum à essayer. On agite, puis on laisse au repos à la température de la chambre et on note l'apparition de la première floculation. Si elle se produit dans le mélange 20 centimètres cubes de toxine + 0 cc. 6 de sérum, on voit que le titre correspondant du sérum dans la table précédente est de 330 unités.

La floculation est plus rapide à l'étuve à 37°-38° et plus rapide encore au bain-marie à 45°, mais, dans la pratique courante des dosages, il convient d'opérer à la température du laboratoire de 18 à 20°.

Avec les sérums chauffés à 55°-56°, le retard dans la floculation est notable. Avec un sérum chauffé à 58°, ce retard est plus considérable encore. Les sérums portés à 60-65° ne floculent plus.

c) Pouvoir toxique et pouvoir floculant de la toxine diphtérique (d'après *G. Ramon*). — Pour comparer le pouvoir toxique et le pouvoir floculant, on prélève chaque jour une petite quantité de bouillon ensemencé de bacilles diphtériques dont on dose, après filtration, le pouvoir toxique *in vivo* par inoculation au cobaye et le pouvoir floculant *in vitro* en présence d'un même sérum antidiphtérique. Jusqu'au huitième jour, pouvoir floculant et pouvoir toxique s'élèvent parallèlement. A partir du 9e jour, le pouvoir toxique baisse alors que le pouvoir floculant se maintient stationnaire pendant plusieurs semaines.

Technique du dosage du pouvoir toxique par la floculation. — Dans une série de tubes à essai contenant 20 centimètres cubes d'une toxine qui, filtrée au huitième jour de la culture et éprouvée immédiatement, tue le cobaye de 250 grammes à la dose de 1/600 de centimètre cube on ajoute des quantités progressivement décroissantes : 2 centimètres cubes, 1 cc. 5, 1 cc. 3, 1 centimètre cube, 0 cc. 9, 0 cc. 6, 0 cc. 3, etc., de sérum antidiphtérique choisi en vue des titrages futurs.

Si la floculation apparaît d'abord dans le tube contenant 20 centimètres c. de toxine + 0 cc. 7 de sérum, par exemple,

c'est que cette quantité de sérum neutralise 600 × 20 = 12.000 doses mortelles ; 1 centimètre cube du même sérum floculera donc en présence de $\frac{12.000 \times 10}{0,7}$ = 17.000 doses mortelles, ce qui correspond à une toxine ayant un pouvoir toxique égal à $\frac{17.000}{20}$ = 850 doses mortelles au centimètre cube. Pour un sérum donné on peut ainsi établir la table de concordance suivante :

Doses de sérum ajoutées à 20 cc. de la toxine dont on veut doser le pouvoir toxique	Pouvoir toxique correspondant à chaque dose de sérum lorsqu'elle provoque la floculation initiale
1 cc. 5 (850 × 1,5) =	1.275 doses mortelles au cc.
1,3, etc	1.105 »
1,2	1 020 »
1,1	935 »
1	850 »
0,9	765 »
0,8	680 »
0,7	595 »
0,6	510 »
0,5 etc.	425 »
0,2 (850 × 0,2)	170 »

En possession de cette table, on peut facilement doser le pouvoir toxique d'une toxine quelconque pendant son élaboration dans la culture. Il suffit, pour cela, de préparer un certain nombre de mélanges renfermant. par exemple, 20 centimètres cubes de la toxine à examiner et des doses décroissantes : 2 ; 1,6 ; 1,4 ; 1 ; 0,9 ; 0,8 ; 0,7, etc... du sérum-test. On ajoute les mélanges, on laisse au repos, on surveille et on note l'apparition de la première floculation qui a lieu, par exemple, avec 0,8. On se reporte à la table de titrage et on lit le nombre correspondant à 0,8, soit 680 doses mortelles au centimètre cube.

CHAPITRE XLVII

DÉTERMINATION ET MESURE DE L'ACTIVITÉ DES PRINCIPALES DIASTASES [1]. — SÉRUMS ANTITRYPTIQUES.

I. — **Hydrolases** (*diastases hydrolysantes*).

a) ***Sucrase*** (par exemple de la levure pressée de boulangerie). — On mélange dans un mortier, 20 grammes de levure avec 10 à 15 grammes de sable siliceux fin, bien lavé. On ajoute peu à peu 5 centimètres cubes d'eau en broyant pendant 5 minutes, puis, toujours par petites portions, encore 40 centimètres cubes d'eau en continuant à broyer. On laisse en contact 30 minutes en agitant de temps en temps, puis on filtre sur papier Chardin mouillé ou on centrifuge.

On fait agir des quantités variables (par exemple 0 cc. 5, 1 centimètre cube, 1 cc. 5, etc.) de cette solution de sucrase sur 10 centimètres cubes de solution de saccharose à 20 p. 100, en présence de 1 centimètre cube de dilution d'acide acétique à 1,5 p. 100 (acidité optima : 1 p. 1000) à la température de 56° (optima), dans un bain-marie à régulateur.

On complète dans chaque tube au même volume avec de l'eau distillée stérile.

Après 30 minutes ou 1 heure, on arrête l'action diastasique en ajoutant à chaque tube quelques gouttes de lessive de soude. On mesure le pouvoir réducteur de chaque tube en comptant le nombre de gouttes nécessaires pour décolorer exactement un mélange bouillant de 2 centimètres cubes de liqueur de Fehling et 2 centimètres cubes d'eau.

b) ***Amylase et Dextrinase.*** — On peut les extraire, par exemple, du malt d'orge de brasserie.

On fait macérer 20 grammes de malt, finement broyé au

1. Pour plus de détails voir le *Guide pour les Manipulations de Chimie biologique*, de *Gab. Bertrand et P. Thomas*, auquel sont empruntées la plupart des notes de ce chapitre (H. Dunod, édit., Paris).

moulin, dans 100 centimètres cubes d'eau froide, pendant cinq heures, en agitant fréquemment. On centrifuge ensuite et on décante le liquide limpide qui renferme à la fois de l'amylase, diastase liquéfiante, et de la dextrinase, diastase qui saccharifie l'amidon. Si l'on chauffe ce liquide pendant 15 minutes entre 80° et 85°, la dextrinase est détruite tandis que l'amylase persiste. Cette dernière ne perd son activité qu'au voisinage de l'ébullition.

L'amylase liquéfie l'empois d'amidon préparé en délayant, par exemple, 6 grammes d'amidon dans 10 centimètres cubes d'eau et en versant le lait ainsi obtenu dans un ballon contenant 90 centimètres cubes d'eau bouillante. On agite vivement. On plonge dans ce ballon un thermomètre et on laisse refroidir à 85°. On ajoute alors 1 centimètre cube du liquide de macération de malt préparé comme il a été dit ci-dessus, en remuant constamment le mélange. La masse se fluidifie bientôt. Lorsque la liquéfaction est totale, on porte à l'ébullition et on laisse refroidir. L'amidon ainsi dissous n'est pas saccharifié. Il bleuit par l'iode et ne réduit pas la liqueur de Fehling.

Le liquide de macération de malt liquéfie et saccharifie simultanément l'empois d'amidon. La température optimum pour cette double action est de 65° à 70°.

Pour mesurer le pouvoir saccharifiant, on utilise, de préférence, un empois d'amidon à 3 p. 100 (au lieu de 6 p. 100).

Dans un ballon contenant 100 centimètres cubes de cet empois maintenu à la température de 65° à 70°, au bain-marie régulateur, on ajoute par exemple 2 centimètres cubes de liquide de macération de malt.

Dans un certain nombre de tubes, on a versé d'autre part 10 centimètres cubes d'eau distillée et 2 ou 3 gouttes de solution d'iode à 1 p. 100. Toutes les deux ou quatre minutes (ou davantage suivant l'activité du malt employé), on prélève 1 centimètre cube du liquide du ballon avec une pipette graduée et on le verse dans l'un des tubes. On obtient ainsi une gamme de coloration depuis le bleu au début jusqu'à une teinte nulle, en passant par le violet, le rouge, le marron et le jaune.

Lorsque la teinte est nulle, on s'assure que le liquide réduit énergiquement la liqueur de Fehling à cause de la

formation de maltose. Il reste encore de la dextrine précipitable en blanc par 4 à 5 volumes d'alcool.

L'*amylase de la salive* saccharifie l'*amidon* et le *glycogène* en les transformant en maltose et en dextrine.

On peut mesurer son activité en faisant agir des quantités variables : 1 centimètre cube, 2,5 centimètres cubes, par exemple, sur une quantité fixe de solution préparée en dissolvant 1 gramme de glycogène dans 5 centimètres cubes d'eau distillée tiède à la température de 40°, au bain-marie. On arrête la réaction après 1 heure. On cherche dans quels tubes le liquide ne se colore plus par l'iode et on précipite dans tous les tubes la dextrine restant par 2 ou 3 volumes d'alcool.

On obtient facilement de la salive en déposant une goutte d'éther ou de chloroforme sur la pointe de la langue. On recueille la sécrétion dans un verre stérile et on filtre sur papier Chardin mouillé.

Les leucocytes et les sérums normaux renferment toujours une petite quantité d'amylase qu'on peut mettre en évidence en laissant à l'étuve, pendant 24 heures à 37°, dans un vase d'Erlenmeyer, 2 centimètres cubes de sérum, par exemple, mélangés à 50 centimètres cubes d'une solution stérilisée d'amidon à 1 p. 100 qu'on additionne de 1 centimètre cube de solution alcoolique de thymol à 1 p. 5, afin d'éviter les fermentations. Après 24 heures, on ramène (avec de l'eau distillée) au volume de 53 centimètres cubes ; on défèque par 5 centimètres cubes de solution de sous-acétate de plomb et on filtre, puis on dose le sucre par la liqueur de Fehling titrée de telle sorte que 1 centimètre cube soit réduit par 5 milligrammes de sucre. Avec le sérum normal humain, on trouve ainsi, en moyenne, 152 milligrammes de sucre formé.

La *préparation du glycogène* s'effectue le mieux en partant des mollusques (moules, huîtres, etc.). On broie leur corps au hache-viande et on en prend 30 grammes, par exemple, qu'on chauffe doucement dans une petite capsule de porcelaine avec 30 centimètres cubes de solution concentrée de potasse (faite avec 60 grammes de potasse en plaques pour 40 centimètres cubes d'eau).

On agite avec une baguette de verre jusqu'à ce que la dissolution soit complète, ce qui prend environ 1 heure. On remplace au fur et à mesure l'eau qui s'évapore pendant le

chauffage. On ajoute ensuite 50 centimètres cubes d'eau et on filtre sur un tampon d'amiante en repassant sur le filtre les premières parties.

A 50 centimètres cubes du liquide filtré, on ajoute 25 centimètres cubes d'alcool à 95°. Le glycogène se précipite. On recueille ce précipité sur un petit filtre en papier Berzélius sans plis, ou mieux on le centrifuge. On le lave avec 10 à 15 centimètres cubes d'alcool à 40°, on l'essore entre deux doubles de papier à filtrer et on sèche à l'étuve, aux environs de 50°. Le glycogène ainsi obtenu est soluble dans l'eau tiède. On neutralise sa solution par l'acide acétique. Une goutte de solution d'iode donne une coloration rouge acajou. Ce liquide additionné de 2 ou 3 gouttes d'acide chlorhydrique et porté à l'ébullition pendant quelques minutes réduit la liqueur de Fehling par suite de la transformation du glycogène en glycose.

On dose le glycogène comme l'amidon, en faisant bouillir avec de l'acide chlorhydrique à 1 p. 20 et en déterminant la quantité de glucose formé.

c) ***Monobutyrinase du sérum. Lipodiastases.*** — On verse dans cinq tubes à essai, 10 centimètres cubes d'une solution aqueuse saturée de monobutyrine. Dans le premier, on ajoute 1 centimètre cube du sérum à étudier, dilué de 1 centimètre cube d'eau et préalablement chauffé (après dilution) 30 minutes à 80° (tube témoin) ; dans les quatre autres, 1 centimètre cube du même sérum frais. On ajoute à chaque tube, 1 goutte de solution alcoolique de phtaléine et on neutralise avec une solution de carbonate de sodium pur à 0,5 p. 100 jusqu'à teinte rose persistant un moment. Les cinq tubes sont alors portés dans un bain-marie réglé à 35-37°.

Après 15 minutes, on constate que le contenu du témoin est resté neutre. Le tube 1 est devenu acide et on compte le nombre de gouttes de la solution de carbonate de sodium nécessaires pour neutraliser. Soit a ce nombre. Au bout de 15 autres minutes on voit que, pour neutraliser ce même tube, il faut verser à peu près a gouttes de carbonate de sodium : or à ce moment, le tube 2 n'exige qu'un nombre de gouttes $b < 2\,a$, ce qui signifie que l'action n'est pas proportionnelle au temps, mais va en se ralentissant. On le

vérifie de nouveau en examinant le tube 3 après 45 minutes et le tube 4 après 1 heure. Le ralentissement est dû à l'acide butyrique mis en liberté, car si on le neutralise, l'action redevient identique à ce qu'elle était au début.

On peut aussi mesurer l'action de la monobutyrinase du sérum sur la monobutyrine par le compte-gouttes de Duclaux (variation de la tension superficielle du liquide).

Pour cela, après avoir mélangé 20 centimètres cubes de solution saturée de monobutyrine avec 1 centimètre cube du sérum frais à étudier et 3 centimètres cubes d'eau, on aspire le liquide dans le compte-gouttes, on essuie l'ajutage inférieur de celui-ci et on compte le nombre de gouttes qui s'écoule de l'appareil. Ce nombre est voisin de 160 pour 5 centimètres cubes de liquide. Il varie avec la température. On recommence l'opération après 15, 30 et 45 minutes. Les nombres obtenus décroissent régulièrement.

En portant en abscisses les temps et en ordonnées le nombre de gouttes correspondant, on peut construire sur un papier quadrillé la courbe représentative du phénomène.

On doit toujours faire une expérience témoin avec un mélange de 20 centimètres cubes de la même solution de monobutyrine avec 4 centimètres cubes de sérum préalablement dilué à 1 p. 4, puis chauffé à 80° pendant 30 minutes. On peut voir que le nombre de gouttes données par ce mélange ne varie pas avec le temps.

La monobutyrinase du sérum saponifie les divers éthers des acides gras monobasiques (acétate, butyrate, etc., d'éthyle ou d'amyle) avec d'autant plus d'intensité que le poids moléculaire du radical acide est plus élevé. Ainsi le butyrate d'éthyle est saponifié au moins 10 fois plus vite que l'acétate d'éthyle.

Les *lipodiastases* que renferment en abondance certaines graines, particulièrement les graines de *ricin*, sont presque inactives en milieu neutre, mais elles agissent plus ou moins énergiquement en présence d'un acide (sol. à 2,5 p. 100 d'acide acétique par exemple).

d) **Pepsine**. — On dissout 0 gr. 10 de la pepsine à étudier dans 60 centimètres cubes, par exemple, d'acide chlorhydrique à 1 p. 100 et on ajoute 2 gr. 50 de fibrine desséchée à basse température (la meilleure fibrine est celle que l'on

obtient en desséchant dans le vide des caillots de sang de bœuf ou de cheval bien débarrassés de globules rouges par lavage prolongé dans l'eau courante).

Ce mélange est porté dans un bain-marie réglé à 50° et agité de temps en temps. La fibrine ne tarde pas à se gonfler et à se dissoudre. Le liquide donne avec intensité les diverses réactions de précipitation des albumoses ; la réaction du biuret devient de plus en plus intense.

Après 6 heures, on laisse refroidir, on filtre et on prélève 10 centimètres cubes du liquide : celui-ci refroidi à 15° sous un courant d'eau froide ne doit plus se troubler par addition de 10 à 20 gouttes d'acide azotique étendu. Les autres réactions des albumoses ont disparu ; celles des peptones persistent seules.

Hammarsten et *Mandel* ont fait observer que la fibrine crue se dissout assez facilement sous l'influence des acides seuls. C'est pourquoi ils recommandent d'employer, pour les titrages de pepsine, de la fibrine préalablement soumise à l'ébullition.

Préparation du suc gastrique de porc. — On prend un estomac de porc qu'on a préalablement bien nettoyé et rincé à grande eau. On le cloue sur une planchette par sa face péritonéale et on enlève la muqueuse avec un bistouri et une pince. On coupe cette muqueuse en menus morceaux et on la hache, puis on fait macérer la pulpe ainsi obtenue pendant 24 heures dans un litre d'eau additionné de 8 centimètres cubes d'acide chlorhydrique. On remue fréquemment le mélange. Le lendemain, on décante le liquide clair et on le filtre sur papier Chardin mouillé ou sur ouate hydrophile. Cette solution doit être utilisée immédiatement, elle ne se conserve pas.

Réactions du suc gastrique.

Violet de méthyle. — On mélange le suc avec un égal volume d'une solution aqueuse très diluée de violet de méthyle. Coloration bleue (acide minéral).

Phloro-glucine et *vanilline.* — On mélange le suc avec un égal volume d'une solution de 2 grammes de phloroglucine et 1 gramme de vanilline dans 100 centimètres cubes d'alcool absolu. On évapore dans un verre de montre sur un bain-marie, sans aller jusqu'à l'ébullition. Il reste une tache rouge qui indique la présence d'un acide minéral.

Tropéoline 00. — On mélange environ 5 centimètres cubes de suc avec quelques gouttes de solution alcoolique à 1 pour 100 de tropéoline 00, une coloration rose indique la présence d'un acide minéral.

e) **Trypsine.** — On fait digérer au bain-marie à la température de 50°, un mélange de 2 gr. 50 de fibrine sèche avec 60 centimètres cubes de solution de carbonate de sodium à 1 pour 100 dans laquelle on a fait dissoudre 0 gr. 20 de la trypsine à essayer. On agite de temps en temps. La fibrine se dissout et le liquide donne les réactions des albumoses. Au bout de 6 heures, ces réactions ont disparu : le liquide ne se trouble plus par addition ménagée d'acide nitrique étendu et ne contient plus que des peptones. Si la digestion est continuée, on voit, peu à peu, la réaction du biuret diminuer d'intensité et le liquide refroidi laisse déposer des cristaux de tyrosine faciles à reconnaître au microscope (fines aiguilles blanches groupées en gerbes ou en rosaces).

Les trypsines pancréatiques contiennent toujours une plus ou moins grande proportion de diastase amylolytique dont on peu mesurer l'activité sur l'empois d'amidon (voir (*Amylase*).

On prépare du suc pancréatique avec un pancréas de porc, ou mieux, de bœuf, qu'on hache finement après l'avoir bien dépouillé de graisse et qu'on fait macérer pendant 24 à 48 heures dans une solution à 2 pour 100 de carbonate de sodium additionnée de quelques gouttes d'une solution alcoolique de thymol pour empêcher la putréfaction. On agite de temps en temps. On filtre à travers une bourre d'ouate hydrophile.

Le liquide ainsi préparé émulsionne très bien les graisses ; il les saponifie et les acidifie. Il peptonise la fibrine et l'albumine en solution alcaline ou neutre. Il hydrolyse l'amidon et le glycogène.

f) **Papaïne.** — L'action de la papaïne croît à mesure qu'on élève la température jusque vers 90°. — Dans deux tubes à essai on verse 2 centimètres cubes d'une solution de papaïne à 5 p. 100. L'un de ces tubes est porté à 100° pendant deux minutes.

On ajoute alors dans les deux tubes, 10 centimètres cubes

de sérum frais de cheval ; on mélange et on plonge dans l'eau d'un bain-marie qu'on chauffe jusqu'à ce qu'un thermomètre placé dans le tube contenant la papaïne non bouillie marque 98°. On retire alors les deux tubes. L'un est plein d'un liquide un peu trouble ; l'autre qui contenait la diastase bouillie est coagulé. Le liquide du premier tube, dont le sérum a été rapidement et complètement digéré, donne les réactions des albumoses.

g) ***Mesure de l'activité protéolytique des cultures de microbes ou des liquides de culture diastasifères.*** — 1) *Méthode des tubes de Mett.* — On sépare un blanc d'œuf frais dans un verre conique et on en remplit par aspiration une série de tubes bien calibrés propres et stériles, longs de 15 à 20 centimètres et de 1 ou 2 millimètres de diamètre intérieur. On les scelle à une extrémité et on les plonge horizontalement dans de l'eau chauffée à la température de 95°. L'albumine se coagule. On coupe ensuite les tubes en tronçons bien égaux de 5 centimètres cubes de longueur. Chacun de ces tronçons forme un test de digestion. Il suffit de l'introduire de telle sorte qu'il ne plonge que par une de ses extrémités dans le tube à essai contenant 5 centimètres cubes, par exemple, de la culture ou du liquide de culture diastasifère, et de porter celui-ci au bain-marie à 38°-40° pendant un temps déterminé, soit 10 heures. On mesure alors avec une règle millimétrique la longueur du cylindre d'albumine coagulée qui a été dissoute et digérée à l'intérieur du tube. L'activité trypsique du liquide diastasifère peut être traduite par un chiffre qui représente le carré du nombre de millimètres du cylindre d'albumine dissous. Par exemple, si, dans un cas, 2 millimètres ont été dissous, et dans un autre 3 millimètres, l'activité trypsique des deux liquides est respectivement de 4 et de 9.

2) *Méthode des tubes de gélatine thymolée.* — Pour étudier l'action liquéfiante des liquides de culture diastasifères sur la gélatine, on prépare, selon la méthode de *Fermi*, une solution de gélatine avec :

Eau distillée.	1 litre.
Gélatine	70 gr.
Thymol.	2 gr.

On stérilise 1 heure à 100° et on neutralise en ajoutant 10 centimètres cubes de solution décinormale de lessives de soude et de potasse en parties égales. On la répartit à chaud, après filtration sur papier Chardin, dans des tubes à essai à raison de 2 centimètres cubes pour chaque tube. On ajoute ensuite, suivant les circonstances, des doses variables de solutions faibles de carbonate de soude ou d'acide phosphorique pour alcaliniser ou acidifier légèrement le milieu s'il n'est pas indiqué de le laisser neutre au tournesol. Enfin on verse, dans chaque tube, le liquide diastasifère et on complète partout avec de l'eau distillée stérile, jusqu'au volume de 10 centimètres cubes. Les tubes sont maintenus (en même temps qu'un témoin sans diastase) dans un bain-marie à la température de 35-40° pendant 10 heures. Après quoi, on les plonge verticalement dans un courant ou un bain d'eau froide et on les y laisse immobiles jusqu'à ce que le tube témoin soit entièrement solidifié. On note alors les tubes dans lesquels la gélatine digérée (transformée en proto ou deutéro-gélatose) plus ou moins complètement, n'est plus coagulable par refroidissement. En partant d'une dose fixe de liquide diastasifère, on peut préciser, par exemple, le nombre d'heures nécessaires à la liquéfaction de 8 centimètres cubes de gélatine à 7 pour 100 par cette dose. Il faut toujours faire des tubes témoins avec la diastase détruite par quelques minutes d'ébullition.

Pour apprécier aussi exactement que possible l'activité protéolytique d'une culture microbienne, filtrée ou non, on peut aussi se servir de tubes calibrés de 2 millimètres de diamètre sur 20 centimètres de longueur gradués en millimètres sur 10 centimètres de leur longueur (pipettes graduées, par exemple, dont on a éliminé par un trait de couteau à verre, la pointe conique) et qu'on remplit aseptiquement de gélatine à 20 pour 100 légèrement colorée et neutralisée. On aspire pour cela, au moyen d'un tube en caoutchouc fixé à l'extrémité supérieure du petit tube et l'on ferme avec une pince lorsque la gélatine est montée à la hauteur voulue. Les petits tubes étant remplis et solidifiés, on les remet dans leurs éprouvettes ou on les transporte, suivant les besoins, dans des tubes contenant le liquide diastasique à étudier. La dissolution, de bas en haut,

de la gélatine indique, en millimètres, dans un temps donné, le pouvoir protéolytique.

3) *Méthode de la caséine.* Pour étudier l'action coagulante ou trypsique des liquides diastasifères sur la caséine, on peut se servir soit de lait normal (dégraissé par centrifugation) additionné de 2 pour 1000 d'acide phénique, soit d'une solution à 2,5 ou 3 pour 100 de caséine dans l'eau de chaux qu'on neutralise à la phénolphtaléine avec de l'acide chlorhydrique.

On opère, dans le premier cas, sur une série de tubes contenant chacun 5 centimètres cubes de lait auquel on ajoute les doses variables d'acide phosphorique ou de carbonate de soude dont on veut observer les effets empêchants ou favorisants, et une quantité fixe de liquide diastasifère, par exemple, puis la quantité d'eau phéniquée à 2 pour 1000 nécessaire pour amener le mélange au volume de 10 ou de 15 centimètres cubes. Après 12 heures d'étuve, à 35-40°, les tubes sont retirés et on apprécie alors par les chiffres 1, 2, 3, le degré de solubilisation de la caséine en prenant comme 0 le tube témoin qui avait reçu le liquide diastasifère préalablement bouilli.

Lorsqu'on se sert de caséine, on voit se former au fond des tubes, sous l'action des diastases protéolytiques, un dépôt floconneux qui devient pulvérulent (nucléines) et que surmonte une couche de liquide de plus en plus transparent.

h) ***Extraction du ferment protéolytique des levures, des microbes en général et des leucocytes.*** — Les levures, particulièrement les levures de boulangerie, produisent en assez grande abondance un ferment protéolytique qu'on peut obtenir de la manière suivante :

5 grammes de levure pressée sont triturés soigneusement dans un mortier avec 30 grammes de carbonate de chaux précipité, pur. On y ajoute 30 grammes de chloroforme. Les cellules de levure s'autolysent ainsi en quelques heures. On verse dans un vase bouché à l'émeri, qu'on laisse pendant 3 à 4 jours à la température du laboratoire. On passe sur un tampon d'ouate hydrophile dans un entonnoir. Le liquide recueilli est additionné de quelques gouttes de toluol et on le porte à l'étuve à 38° pendant 36 heures. On

filtre ensuite sur une petite bougie Chamberland à grand débit (marque L) ou sur un petit filtre Berkefeld en terre d'infusoires. On obtient ainsi une solution toute prête pour l'usage. Il faut l'utiliser le plus rapidement possible.

Beaucoup de microbes (staphylocoque, bac. pyocyanique, etc...) produisent également de grandes quantités de diastases protéolytiques vis-à-vis desquelles les sérums normaux exercent une action antiprotéolytique.

Les leucocytes renferment également une diastase protéolytique dont l'activité ne se manifeste *in vitro* qu'après leur destruction par chauffage prolongé (18 à 24 heures) dans un bain-marie réglé à 50-52°.

i) ***Mesure du pouvoir antiprotéolytique ou antitryptique des sérums normaux ou pathologiques.*** — Certains sérums pathologiques (pneumonie, néphrite, tuberculose, parfois fièvre typhoïde, etc...) *principalement les sérums de malades cancéreux*, ont un pouvoir *antiprotéolytique* beaucoup plus intense que celui du sérum normal.

La meilleure méthode pour mesurer le pouvoir antiprotéolytique de ces sérums est la suivante :

On prépare une série de boîtes de Pétri dans lesquelles on verse une quantité de sérum stérile (de bœuf, de cheval ou de mouton) suffisante pour former une couche de 4 à 5 millimètres d'épaisseur. On dispose ces boîtes bien horizontalement dans une étuve à coaguler, réglée à 72° et, lorsque le sérum est solidifié, on les porte à l'étuve à 37° en position renversée (le couvercle tourné en bas) afin d'en dessécher la surface. Après 24 à 48 heures, on peut les employer.

On fait, d'autre part, avec une bonne trypsine commerciale, une solution à 1 pour 100 dans l'eau salée physiologique à 8 grammes 5 pour 1000.

Dans une série de petits tubes à essais, on verse d'abord une même quantité de cette solution : 1 centimètre cube ; puis (sauf dans le 1er tube qui servira de témoin) on verse, dans chaque tube, une quantité progressivement décroissante du sérum à expérimenter (lequel doit être fraîchement recueilli et non chauffé), soit 1 centimètre cube dans le 2e tube, 0 cc. 8, 0 cc. 5, 0 cc. 4, 0 cc. 2, 0 cc. 1 ou même des dilutions plus étendues, par exemple 0 cc. 08, 0 cc. 06, etc.,

d'une dilution de sérum à 1 pour 10 dans l'eau salée physiologique. On mélange soigneusement par agitation le contenu de chaque tube ; puis, avec une anse de platine (flambée à chaque nouvelle prise), on porte successivement sur divers points d'une même boîte de Pétri, à partir d'un endroit préalablement marqué, d'abord 1 goutte de la solution de trypsine pure (tube 1) et bien séparément les unes des autres, à 1 centimètre au moins d'intervalle, une goutte de chacun des mélanges trypsine sérum. On porte ensuite, pendant 24 heures la boîte dans une petite étuve réglée à 52° et on lit les résultats qu'on apprécie d'après l'existence ou la non-existence d'une *cupule de sérum digéré* sous les diverses gouttes.

Le sérum normal humain est généralement antitryptique à la dose de 1 pour 1, alors que les sérums de cancéreux sont souvent actifs à la dose de 1/8, quelquefois même de 1/20 de centimètre cube pour 1 centimètre cube de solution de trypsine.

j) ***Oxydases et peroxydiastases.*** — Les oxydases vraies fixent l'oxygène sur les corps oxydables. Telles sont la *laccase* des arbres à laque (Anacardiacées du Japon), celle d'autres végétaux (luzerne, champignons : Russule, lactaire), la *tyrosinase* du son de blé, des artichauts, des tubercules de dahlia, de certains champignons (Russule), et celle que l'on trouve en plus ou moins grande abondance dans les cellules leucocytaires, les cellules pigmentaires (particulièrement dans la mélanose, tumeurs mélaniques du cheval, etc.), le pus, la bile et certains tissus glandulaires animaux.

Pour déceler leur présence, on peut se servir d'un simple tube à essai de 12 ou de 20 millimètres de diamètre sur 200 millimètres de longueur, dans lequel on introduit un autre tube plus petit de 5 millimètres de diamètre par exemple et court (de 50 millimètres de longueur). Dans ce plus petit tube, on met quelques gouttes du liquide à étudier. Dans le gros tube, on verse 50 centimètres cubes d'un réactif oxydable, par exemple une solution de gaïacol à 1 pour 100 dans l'eau distillée, ou une solution de tyrosine à 0,1 pour 100. On introduit avec précaution, en position inclinée à 45°, le petit tube dans le grand, de telle sorte

que les liquides ne se mélangent pas. On fixe alors, sur l'orifice du gros tube, un bon bouchon de caoutchouc percé d'un trou que traverse un tube en verre étranglé légèrement en un point, et relié, d'une part, à une trompe ou à une pompe à vide, d'autre part à un appareil producteur d'acide carbonique. On fait le vide, puis, interrompant la communication avec la trompe, on laisse rentrer dans le gros tube de l'acide carbonique. On fait de nouveau le vide et on renouvelle la rentrée d'acide carbonique deux ou trois fois pour chasser complètement l'oxygène. Finalement, sur le vide aussi parfait que possible on scelle le tube étranglé, entre le bouchon de caoutchouc et la trompe, et on retourne l'appareil, de manière à mélanger le contenu du petit tube à celui du gros tube. Il ne se produit aucune coloration même après plusieurs jours.

Lorsqu'on vient à briser la pointe effilée et qu'on laisse rentrer de l'air au contact du liquide, celui-ci se colore peu à peu s'il renferme une oxydase.

Les principaux réactifs révélateurs des oxydases sont :

1° *La teinture de résine de gaïac* fraîchement préparée et conservée à l'abri de l'air pour éviter l'oxydation rapide de l'acide gaïacolique Bleuissement immédiat.

2° *Le gaïacol* en solution à 1 pour 100 dans l'eau distillée. Précipité de couleur jaune rougeâtre.

3° *L'hydroquinone* en solution à 1 pour 100 dans l'eau distillée. Transformation en quinone de couleur jaune brun et d'odeur caractéristique.

4° *Le pyrogallol* à 1 pour 60 dans l'eau distillée. Précipité rouge orangé, pouvant former des aiguilles (purpurogalline).

Les *peroxydiastases* ou *oxydases indirectes* n'agissent qu'en décomposant les peroxydes et en libérant de l'oxygène libre.

Sang. — C'est ainsi que l'hémoglobine du sang renferme une peroxydiastase qui libère une partie de l'oxygène de l'eau oxygénée, de telle sorte que son mélange avec celle-ci développe les réactions des oxydases.

On reconnaît la présence de traces de sang dans un liquide en ajoutant, à 10 centimètres cubes de ce liquide, 1 centimètre cube de teinture de gaïac fraîche, puis 1 goutte d'eau neutralisée par l'eau de baryte. Il se développe une belle couleur bleu indigo caractéristique.

Lait. — On peut distinguer le lait cru du lait bouilli en ajoutant, par exemple, à 10 centimètres cubes de lait 0 cc. 5 de teinture de gaïac et 1 goutte d'eau oxygénée neutralisée par l'eau de baryte. Le lait cru donne une coloration bleue ; le lait bouilli reste incolore. Mais le lait bouilli doit être refroidi car, à chaud, la réaction peut encore se produire comme dans le lait cru.

On peut remplacer la teinture de gaïac par 4 à 5 centimètres cubes de solution de gaïac à 1 pour 100 dans l'eau distillée. Lorsqu'on ajoute ensuite 1 goutte d'eau oxygénée neutralisée, le lait cru se colore en rose, le lait bouilli reste blanc.

Essai de Storch (peroxydase). — A 10 centimètres cubes de lait, on ajoute 2 gouttes d'eau oxygénée à 1 pour 100 et 2 gouttes de solution aqueuse fraîche, à 2 pour 100, de paraphénylènediamine. Le lait non chauffé ou chauffé à une température inférieure à 70° prend une coloration bleue. Le lait chauffé reste blanc.

Recherche des catalases du lait. — On introduit dans un uréomètre d'Yvon, 10 centimètres cubes de lait à examiner (bien mélanger au préalable) et 5 centimètres cubes d'eau oxygénée à 10 ou 12 volumes. On obture rapidement en fermant le robinet. On agite vigoureusement et on attend 10 minutes. On rétablit, sur la cuve à mercure ou sur la cuve à eau, les niveaux de façon à mesurer le volume d'oxygène dégagé sous pression normale. Il faut opérer à une température voisine de 20 à 25°.

k) ***Ferment glycolytique du sang.*** — Ce ferment transforme en acide lactique le sucre qui existe normalement dans le sang en quantités variables de 0 gr. 5 à 1 gr. 5 par litre.

Cette transformation n'a plus lieu si, au sortir des vaisseaux, le sang est additionné de 2 pour 1000 de fluorure de sodium. Elle n'est, au contraire, pas gênée par l'oxalate de sodium à 1 pour 1000 qui rend également le sang incoagulable. Il faut donc se servir du fluorure de sodium si l'on veut doser le sucre du sang. Ce dosage s'effectue suivant la méthode indiquée par *Gab. Bertrand* et *P. Thomas* (*Guide pour les manipulations de chimie biologique*).

CHAPITRE XLVIII

APPENDICE.

TABLES DE DILUTIONS

(d'après J. ROSENAU ET ANDERSON).

POUR LE TITRAGE DES TOXINES ET DES SÉRUMS

Table I.

Dil. A (1 cc. + 99 cc. H^2O physiol.) 1 cc. = 0,01 = 1 p. 100.
Dil. B (1 cc. + 9 cc. H^2O physiol.) 1 cc. = 0,001 = 1 p. 1.000.

1 cc. 1	=	0,0011	ou	1/909
1,2	=	0,0012	»	1/833
1,3	=	0,0013	»	1/769
1,4	=	0,0014	»	1/714
1,5	=	0,0015	»	1/666
1,6	=	0,0016	»	1/625
1,7	=	0,0017	»	1/588
1,8	=	0,0018	»	1/555
1,9	=	0,0019	»	1/526
2	=	0,0020	»	1/500
2,1	=	0,0021	»	1/476
2,2	=	0,0022	»	1/454
2,3	=	0,0023	»	1/435
2,4	=	0,0024	»	1/417
2,5	=	0,0025	»	1/400
2,6	=	0,0026	»	1/384
2,7	=	0,0027	»	1/370
2,8	=	0,0028	»	1/357
2,9	=	0,0029	»	1/345
3	=	0,0030	»	1/333
3,5	=	0,0035	»	1/285

Table II.

Dil. A. 1 cc. = 0,01 (1 cc. + 99 cc. H^2O phys.) = 1 p. 100.
Dil. B 1 cc. = 0,0005 (1 A + 19 cc. H^2O phys.) = 1 p. 2.000.

1 cc. 1 B	=	0,00055	ou	1/1,818
1,2	=	0,00060	»	1/1,666
1,3	=	0,00065	»	1/1,538
1,4	=	0,00070	»	1/1,428
1,5	=	0,00075	»	1/1,333
1,6	=	0,00080	»	1/1,250

1,7	=	0,00085	ou	1/1,174
1,8	=	0,00090	»	1/1,111
1,9	=	0,00095	»	1/1.057
2	=	0,001	»	1/1,000
2,1	=	0,00105	»	1/952
2,2	=	0,00110	»	1/909
2,3	=	0,00115	»	1/869
2,4	=	0.00120	»	1/833
2,5	=	0.00125	»	1/800
2 6	=	0.00130	»	1/769
2,7	=	0 00135	»	1/741
2,8	=	0,00140	»	1/714
2,9	=	0,00145	»	1/689
3	=	0,00150	»	1/666
3,5	=	0,00175	»	1/571

Table III.

Dil. A 1 cc. = 0,01 (1 cc. + 99 cc. H^2O phys.) = 1 p. 100.
Dil. B 1 cc. = 0,00033 (1 A + 29 H^2O phys.) = 1 p. 3.000.

1 cc. 1 B	=	0,00036	ou	1/2,777
1,2	=	0.00040	»	1/2.500
1,3	=	0,00043	»	1/2.302
1,4	=	0,00046	»	1/2,173
1,5	=	0,00050	»	1/2,000
1,6	=	0.00053	»	1/1 850
1,7	=	0,00056	»	1/1 786
1,8	=	0,00060	»	1/1,660
1,9	=	0.00063	»	1/1,587
2	=	0,00066	»	1/1.515
2,1	=	0,00070	»	1/1,428
2,2	=	0.00073	»	1/1.369
2,3	=	0,00076	»	1/1,304
2,4	=	0,00080	»	1/1,250
2,5	=	0,00083	»	1/1,200
2,6	=	0,00086	»	1/1.154
2,7	=	0.00090	»	1/1.111
2,8	=	0,00093	»	1/1 071
2,9	=	0,00096	»	1/1,034
3	=	0,001	»	1/1 000
3,5	=	0.00116	»	1/857

Table IV.

Dil. A 1 cc. = 0,01 (1 cc. + 99 cc. H^2O phys.) = 1. p. 100.
Dil. B 1 cc. = 0,00025 (1 cc. A + 39 H^2O phys.) = 1 p. 4.000.

1 cc. 1 B	=	0,000275	ou	1/3,636
1,2	=	0,000300	»	1/3,333
1,3	=	0.000325	»	1/3,077
1,4	=	0.000350	»	1/2.860
1,5	=	0,000375	»	1/2.666
1.6		0,000400	»	1/2,500
1,7	=	0,000425	»	1/2,353
1,8	=	0.000450	»	1/2,222
1,9	=	0,000475	»	1/2,105

2	=	0,000500	ou	1/2,000
2,1	=	0,000525	»	1/1,905
2,2	=	0,000550	»	1/1,818
2,3	=	0,000575	»	1/1,739
2,4	=	0,000600	»	1/1,666
2,5	=	0,000625	»	1/1,600
2,6	=	0,000650	»	1/1,538
2,7	=	0,000675	»	1/1,481
2,8	=	0,000700	»	1/1,428
2,9	=	0,000725	»	1/1,379
3	=	0,000750	»	1/1.333
3,5	=	0,000875	»	1/1,143

Table V.

Dil. A 1 cc. = 0,01 (1 cc. + 99 cc. H^2O phys.) = 1 p. 100.
Dil. B 1 cc. = 0,0002 (1 cc. 1 A + 49 H^2O phys.) = 1 p. 5.000.

1,1 B	=	0,00022	ou	1/4,545
1,2	=	0,00024	»	1/4,170
1,3	=	0,00026	»	1/3,846
1,4	=	0,00028	»	1/3,571
1,5	=	0,00030	»	1/3,333
1,6	=	0,00032	»	1/3,125
1,7	=	0,00034	»	1/2,941
1,8	=	0 00036	»	1/2,777
1,9	=	0,00038	»	1/2,631
2	=	0,00040	»	1/2,500
2,1	=	0,00042	»	1/2,381
2,2	=	0,00044	»	1/2,272
2,3	=	0,00046	»	1/2,173
2,4	=	0,00048	»	1/2,083
2,5	=	0,00050	»	1/2,000
2,6	=	0,00052	»	1/1,923
2,7	=	0,00054	»	1/1,851
2,8	=	0,00056	»	1/1,786
2,9	=	0,00058	»	1/1,724
3	=	0,00060	»	1/1,666
3,5	=	0,00070	»	1/1,428

Table VI.

Dil. A 1 cc. = 0,01 (1 cc. + 99 cc. H^2O phys.) = 1 p. 100.
Dil. B 1 cc. = 0,000017 (1 cc. A + 59 HO^2 phys.) = 1 p. 6.000.

1,1 B	=	0,000183	ou	1/5,454
1.2	=	0,000199	»	1/5,000
1,3	=	0,000216	»	1/4,615
1,4	=	0,000233	»	1/4,285
1,5	=	0,000249	»	1/4 000
1,6	=	0,000266	»	1/3,750
1,7	=	0,000283	»	1/3,529
1,8	=	0,000300	»	1/3,333
1,9	=	0,000317	»	1/3,158
2	=	0,000333	»	1/3,000
2,1	=	0 000350	»	1/2,857
2,2	=	0,000367	»	1/2,727

2,3	=	0,000383	ou	1/2,609
2,4	=	0,000400	»	1/2,500
2,5	=	0,000417	»	1/2,400
2,6	=	0,000433	»	1/2,307
2,7	=	0,000450	»	1/2,222
2,8	=	0,000467	»	1/2,143
2,9	=	0,000483	»	1/2,069
3	=	0,000500	»	1/2 000
3,5	=	0,000583	»	1/1,114

Table VII.

Dil. A 1 cc. = 0,01 (1 cc. + 99 cc. H^2O phys.) = 1 p. 100.
Dil. B 1 cc. = 0,000143 (1 cc. A + 69 H^2O phys.) = 1 p. 7.000.

1,1 B	=	0,000157	ou	1/6,363
1,2	=	0,000171	»	1/5,833
1,3	=	0,000185	»	1/5,385
1,4	=	0,000200	»	1/5,000
1,5	=	0,000214	»	1/4,666
1,6	=	0,000229	»	1/4,375
1,7	=	0,000243	»	1/4,118
1,8	=	0.000257	»	1/3,888
1,9	=	0,000271	»	1/3,684
2	=	0,000285	»	1/3,500
2,1	=	0,000300	»	1/3,333
2,2	=	0,000314	»	1/3,181
2,3	=	0,000329	»	1/3,043
2,4	=	0.000343	»	1/2,916
2,5	=	0.000357	»	1/2.800
2,6	=	0,000371	»	1/2 692
2,7	=	0,000385	»	1/2,592
2,8	=	0,000400	»	1/2,500
2,9	=	0,000414	»	1/2,414
3	=	0,000429	»	1/2,333
3,5	=	0,000500	»	1/2,000

Table VIII.

Dil. A 1 cc. = 0,01 (1 cc. + 99 cc. H^2O phys.) = 1 p. 100.
Dil. B 1 cc. = 0,000125 (1 cc. A + 79 H^2O phys.) = 1 p. 8.000

1 cc. 1 B	=	0,000137	ou	1/7,272
1,2	=	0,000150	»	1/6,666
1,3	=	0,000162	»	1/6.154
1,4	=	0,000175	»	1/5,714
1,5	=	0,000187	»	1/5,333
1,6	=	0 000200	»	1/5,000
1,7	=	0,000212	»	1/4,706
1,8	=	0,000225	»	1/4,444
1,9	=	0,000237	»	1/4,210
2	=	0,000250	»	1/4,000
2,1	=	0,000262	»	1/3,809
2,2	=	0,000275	»	1/3,636
2,3	=	0,000287	»	1/3,478
2,4	=	0,000300	»	1/3,333
2,5	=	0,000312	»	1/3,200

2,6	=	0,000325	ou	1/3,077
2,7	=	0,000337	»	1/2,962
2,8	=	0,000350	»	1/2,860
2,9	=	0,000362	»	1/2,758
3	=	0,000375	»	1/2,666
3,5	=	0,000437	»	1/2,286

Table IX.

Dil. A 1 cc. = 0 01 (1 cc. + 99 cc H^2O phys.) = 1 p. 100.
Dil. B 1 cc. = 0,000111 (1 cc. A + 89 H^2O phys.) = 1 p. 9.000.

1 cc. 1 B	=	0,000122	ou	1/8,173
1,2	=	0,000133	»	1/7,500
1,3	=	0,000144	»	1/6,923
1,4	=	0,000155	»	1/6,428
1,5	=	0,000166	»	1/6,000
1,6	=	0 000177	»	1/5,625
1.7	=	0,000188	»	1/5,293
1.8	=	0,000200	»	1/5.000
1,9	=	0,000211	»	1/4,736
2	=	0,000222	»	1/4,500
2,1	=	0,000233	»	1/4,286
2,2	=	0,000244	»	1/4,091
2,3	=	0,000255	»	1/3,913
2,4	=	0.000266	»	1/3,750
2.5	=	0,000277	»	1/3,600
2,6	=	0,000288	»	1/3,461
2,7	=	0,000300	»	1/3,333
2.8	=	0,000311	»	1/3,214
2,9		0,000333	»	1/3,103
3	=	0.000344	»	1/3,000
3,5	=	0,000388	»	1/2,571

Table X.

Dil. A 1 cc. = 0,01 (1 cc. + 99 cc. H^2O phys.) = 1 p. 100.
Dil. B 1 cc. = 0,0001 (1 cc. A + 99 H^2O phys.) = 1 p. 10.000.

1 cc. 1 B	=	0,00011	ou	1/9,090
1,2	=	0,00012	»	1/8,333
1,3	=	0,00013	»	1/7 682
1,4	=	0,00014	»	1/7,143
1,5	=	0,00015	»	1/6,666
1,6	=	0,00016	»	1/6,250
1,7	=	0,00017	»	1/5.882
1,8	=	0,00018	»	1/5,555
1,9	=	0,00019	»	1/5,263
2	=	0,00020	»	1/5,000
2,1	=	0,00021	»	1/4,762
2,2	=	0,00022	»	1/4,545
2.3	=	0,00023	»	1/4,348
2,4	=	0,00024	»	1/4 166
2,5	=	0,00025	»	1/4,000
2 6	=	0,00026	»	1/3 846
2,7	=	0,00027	»	1/3,703
2,8	=	0,00028	»	1/3,571

2,9	=	0,00029	ou	1/3 448
3	=	0,00030	»	1/3,333
3,5	=	0,00035	»	1/3,000

Table XI.

Dil. A 1 cc. = 0,01 (1 cc. + 99 cc. H^2O phys) = 1 p. 100.
Dil. B 1 cc. = 0,001 (1 cc. A + 9 cc. H^2O phys.) = 1 p. 1.000.
Dil. C 1 cc. = 0 00005 (1 cc. B + 19 cc. H^2O phys.) = 1 p. 20.000.

1 cc. 1 C	=	0,000055	ou	1/18,181
1 2	=	0,000060	»	1/16,666
1.3	=	0,000065	»	1/15,385
1,4	=	0,000070	»	1/14,285
1,5	=	0,000075	»	1/13.333
1.6	=	0,000080	»	1/12,500
1,7	=	0,000085	»	1/11 764
1,8	=	0,000090	»	1/11,111
1,9	=	0,000095	»	1/10,526
2	=	0,000100	»	1/10,000
2,1	=	0.000105	»	1/ 9.524
2,2	=	0,000110	»	1/ 9,090
2,3	=	0,000115	»	1/ 8,695
2,4	=	0,000120	»	1/ 8,333
2,5	=	0 000125	»	1/ 7.600
2,6	=	0,000130	»	1/ 7.615
2,7	=	0,000135	»	1/ 7,407
2,8	=	0,000140	»	1/ 7,143
2,9		0,000145	»	1/ 6 896
3	=	0 000150	»	1/ 6,666

Table XII.

Dil. A 1 cc. = 0,01 (1 cc. + 99 cc. eau phys.) = 1 p. 100
Dil. B 1 cc. = 0,001 (1 cc. A + 9 cc. H^2O phys.) = 1 p. 1 000.
Dil. C 1 cc. = 0,000033 (1 cc. B + 29 H^2O phys.) = 1 p. 30.000.

1 cc. 1 C	=	0,000036	ou	1/37,322
1,2	=	0,000040	»	1/25,000
1,3	=	0.000043	»	1/23,095
1,4	=	0,000046	»	1/21,428
1.5	=	0,000050	»	1/20 000
1,6	=	0,000053	»	1/18,761
1,7	=	0 000056	»	1/17.668
1,8	=	0,000060	»	1/16.666
1,9	=	0,000063	»	1/15,799
2	=	0 000066	»	1/15 000
2,1	=	0.000070	»	1/14 285
2,2	=	0 000073	»	1/13,642
2 3	=	0,000076	»	1/13,055
2,4	=	0,000080	»	1/12,600
2,5	=	0,000083	»	1/12,000
2,6	=	0,000086	»	1/11,547
2,7	=	0,000090	»	1/11,111
2,8	=	0,000093	»	1/10,504
2,9	=	0,000096	»	1/10,352
3	=	0,0001	»	1/10,000

Table XIII.

Dil. A 1 cc. = 0,01 (1 cc. + 99 cc. H^2O phys) = 1 p. 100.
Dil. B 1 cc. = 0,001 (1 cc. A + 9 cc. H^2O phys.) = 1 p. 1.000.
Dil. C 1 cc. = 0,000025 (1 cc. B + 39 H^2O phys.) = 1 p. 40 000.

1 cc. 1 C	=	0,000027	ou	1/36,363
1,2	=	0,000030	»	1/33,333
1,3	=	0,000032	»	1/30,769
1,4	=	0,000035	»	1/28.571
1,5	=	0 000037	»	1/26,666
1,6	=	0,000040	»	1/25,000
1,7	=	0,000042	»	1/23,529
1,8	=	0,000045	»	1/22,222
1.9	=	0 000047	»	1/21,053
2	=	0,000050	»	1/20,000
2,1	=	0,000052	»	1/19,048
2,2	=	0,000055	»	1/18,181
2,3	=	0,000057	»	1/17,391
2,4	=	0,000060	»	1/16,666
2,5	=	0,000062	»	1/16,000
2,6	=	0,000065	»	1/15,384
2,7	=	0,000067	»	1/14,814
2,8	=	0,000070	»	1/14,285
2 9	=	0.000072	»	1/13.793
3	=	0,000075	»	1/13,333

Table XIV.

Dil. A 1 cc. = 0,01 (1 cc. + 99 cc. H^2O phys.) = 1 p. 100.
Dil. B 1 cc. = 0,001 (1 cc. A + 9 cc. H^2O phys.) = 1 p. 1.000.
Dil. C 1 cc. = 0,00002 (1 cc. B + 49 H^2O phys.) = 1 p. 50.000.

1 cc. 1 C	=	0,000022	ou	1/45,454
1,2	=	0,000024	»	1/41.466
1,3	=	0,000026	»	1/38.431
1,4	=	0,000028	»	1/35.714
1,5	=	0,000030	»	1/33,333
1,6	=	0.000032	»	1/31,250
1,7	=	0.000034	»	1/29,412
1,8	=	0,000036	»	1/27,377
1,9	=	0,000038	»	1/26,316
2	=	0,0 0040	»	1/25,000
2,1	=	0,000042	»	1/23,809
2,2	=	0,000044	»	1/22,818
2,3	=	0,000046	»	1/21.739
2.4	=	0,000048	»	1/20,833
2.5	=	0 000050	»	1/20,000
2,6	=	0,000052	»	1/19,230
2,7	=	0,000054	»	1/18,518
2,8	=	0,000056	»	1/17.857
2,9	=	0,000058	»	1/17,241
3	=	0,000060	»	1/16,666

SEPTIÈME PARTIE

DÉSINFECTION

CHAPITRE XLIX

DÉSINFECTANTS ET ANTISEPTIQUES. — DESTRUCTION DES ECTOPARASITES ANIMAUX.

a) Crésylol sodique.

Crésylol officinal. . . .	1 kgr. (de densité environ 1.045)
Soude caustique liquide.	1 kgr.

Effectuer le mélange dans un vase en grès ou en métal émaillé, car il dégage beaucoup de chaleur qui ferait éclater le verre.

S'emploie en solution à 40 grammes par litre. Le crésylol sodique renferme 50 p. 100 de soude caustique. Son point d'ébullition varie de 185 à 205°.

b) Lysol (Crésyl-oléine-potasse). — Très soluble, ne tache pas le linge et n'est pas caustique pour les muqueuses. S'emploie en solutions à 40 grammes par litre dans l'eau distillée ou de pluie. L'eau de robinet, si elle est calcaire, forme un précipité qui trouble la solution.

c) Chlorure de chaux. — Solution à 10 grammes par litre. On délaye d'abord 100 grammes de chlorure de chaux du commerce dans un litre d'eau. On étend ensuite à 10 volumes avec de l'eau tiède à 40-50° au moment d'en faire usage. La dose de 10 grammes de chlorure de chaux correspond à 1 litre de chlore, si le chlorure de chaux titre 100°, c'est-à-dire renferme 100 litres ou 321 gr. 5 de chlore par kilogramme. Mais la teneur en chlore du chlorure de chaux ou hypochlorite du commerce est variable (de 90 à

130° ordinairement). Il faut donc reconnaître, par un titrage chlorométrique préalable, celle du produit qu'on veut employer.

d) Eau de Javel. — Dilution à 25 grammes par litre, correspondant à 2 gr. 5 de chlore actif par litre.

(Même observation que pour le chlorure de chaux pour la teneur en chlore. L'eau de Javel du commerce renferme habituellement de 60 à 100 grammes de chlore actif par litre).

e) Liqueur de Labarraque. — (Hypochlorite de soude ou chlorure de soude liquide du Codex, titrant 2 fois son volume de chloré actif).

S'emploie en solutions à 50 ou 100 grammes par litre, principalement pour les lavages et la désinfection des muqueuses des cavités naturelles.

Nota. — L'efficacité des divers produits à base de chlore dépend de leur teneur en chlore. Or celle-ci est très variable. Il importe donc d'en préciser le titre, ce qu'on peut faire aisément de la manière suivante :

On pèse 10 grammes d'hypochlorite de chaux ou d'eau de Javel et on dissout ou délaye dans une quantité d'eau distillée suffisante pour porter le volume à 1 litre.

On verse 25 centimètres cubes de cette solution dans une fiole conique dans laquelle on ajoute 2 grammes d'iodure de potassium dissous et quelques gouttes d'acide chlorhydrique pour acidifier légèrement. Puis on dose l'iode mis en liberté par une solution d'hyposulfite de sodium à 24 gr. 800 par litre (hyposulfite cristallisé purifié). 1 centimètre cube de cette solution correspond à 3 milligr. 55 de chlore actif.

f) Antiformine. — Constituée par parties égales de la liqueur chlorurée calcique et sodique de la Pharmacopée anglaise et d'une solution à 15 p. 100 de soude caustique.

La formule de la liqueur chlorurée calcique et sodique de la Pharmacopée anglaise est la suivante :

Carbonate de soude.	60 gr.
Chlorure de chaux sec.	40 gr.
Eau distillée	400 cc.

Dissoudre le carbonate de soude dans 100 centimètres cubes d'eau distillée ; triturer ensuite le chlorure de chaux dans 300 centimètres cubes d'eau distillée ; filtrer séparément les deux liqueurs, les mélanger et filtrer de nouveau.

g) Lait de chaux. — 1 kilo de chaux éteinte pour 4 litres d'eau. (On éteint la chaux en délitant 1 kilo de chaux vive avec 500 grammes d'eau qu'on ajoute par petites portions.)

Pour désinfecter les déjections, il faut mélanger celles-ci avec 2 p. 100 de lait de chaux fraîchement préparé. Contact au moins *six heures*.

h) Aldéhyde formique ou formol. — Solution à 40 grammes par litre d'eau (40 centimètres cubes de solution commerciale à 40 p. 100, dans un mélange d'eau et d'alcool méthylique à parties égales).

En vapeurs 2 gr. 5 à 5 grammes par mètre cube (voir tables de désinfection ci-après).

Pour l'usage, la solution commerciale d'aldéhyde formique à vaporiser doit toujours être étendue d'au moins 4 fois son volume d'eau afin d'éviter la polymérisation.

Les vapeurs d'aldéhyde formique se combinent avec l'ammoniaque pour former une hexaméthylène-diamine qui n'a pas d'odeur ; d'où la possibilité de faire disparaître rapidement l'odeur de formol dans les locaux désinfectés, en y pulvérisant de l'ammoniaque.

i) Désinfection des locaux par l'aldéhyde formique et le permanganate de potassium, a froid, sans appareils (Procédé de R. Doerr et H. Raubitschek). — Ce procédé, employé depuis 1908 pour la désinfection officielle en Allemagne, présente les avantages suivants :

1° Suppression de tout appareil coûteux ;

2° Il n'est pas nécessaire de fermer hermétiquement les locaux, ni de coller du papier sur les interstices des fenêtres, des portes, etc..., comme c'est le cas pour les autres procédés ;

3° Ce procédé est si simple qu'il est à la portée de tout le monde ;

4° Il n'y a pas de danger d'incendie ;

Désinfection des locaux par les vapeurs de formol.

Table I. — (Désinfection simple par 2 gr. 5 de formol par mètre cube.)

Dimension du local en mc.	Quantité de sol. commerciale de formol à 40 %	Proportion d'eau à ajouter	Quantité d'alcool à 90° pour évaporer le mélange	Quantité d'ammoniaque (sol. à 25 %) à évaporer après 7 heures de contact (au moins)	Quantité d'alcool à 90° pour évaporer l'ammoniaque
10	200	800	100	100	10
20	250	1 000	250	200	20
30	300	1.200	300	250	25
40	400	1.600	400	350	35
50	450	1.800	500	400	45
60	500	2.000	600	500	50
70	550	2.200	650	600	55
80	650	2.600	750	650	65
90	700	2.800	850	750	75
100	750	3 000	950	800	80
110	800	3.200	1.050	900	90
120	900	3.600	1.150	1.000	100
130	950	3 800	1.200	1.050	105
140	1.000	4.000	1.300	1.150	110
150	1.050	4.200	1.400	1.200	120

Nota. — Avec 2 gr. 5 de formol par mètre cube, la durée de contact doit être au minimum de 7 heures. Puis on évapore l'ammoniaque et, une heure et demie après, on peut aérer les locaux (les ouvertures doivent avoir été préalablement obturées avec du papier gommé).

Table II. — (Désinfection double par 5 gr. de formol par mètre cube).

Dimension du local en mètres cubes	Quantité de sol. commerciale de formol à 40 %	Proportion d'eau à ajouter	Quantité d'alcool à 90° pour évaporer le mélange	Quantité d'ammoniaque (sol. à 25 %) à évaporer après 4 heures de contact (au moins)	Quantité d'alcool à 90° pour évaporer l'ammoniaque
10	400	600	100	150	15
20	500	750	250	300	30
30	600	900	300	400	40
40	800	1.200	400	550	50
50	900	1 350	500	600	60
60	1.000	1 500	600	750	75
70	1.100	1.650	650	900	90
80	1.300	1.950	750	1.000	100
90	1.400	2.100	900	1.150	120
100	1.500	2.250	950	1.200	130
110	1.600	2.400	1 050	1.350	140
120	1.800	2.700	1.150	1.500	150
130	1.900	2.850	1.200	1.600	160
140	2.000	3.000	1.300	1.750	170
150	2.100	3.150	1 400	1.800	180

Nota. — Avec 5 gr. de formol par mètre cube, la durée de contact doit être de 4 heures (minimum 3 h. 1/2). Puis on évapore l'ammoniaque et, une heure et demie après, on peut aérer les locaux.

5° Il est moins cher que tous les autres.

Il faut, pour la désinfection : 1° formol de commerce à 40 p. 100, qu'on étend de la même quantité d'eau ; 2° permanganate de potassium cristallisé ; 3° de grands vases dans lesquels on verse la solution de formol sur le permanganate de potassium.

D'après le tableau établi par les auteurs, un local de 50 m³ (on calcule le volume du local en multipliant la longueur par la largeur, puis par la hauteur) nécessite, pour être désinfecté : 1 kilo de permanganate de potassium cristallisé et 2 litres de formol à 40 p. 100, étendus d'eau. Il faut surtout veiller à ce que les vases soient très grands et employer, dans le cas ci-dessus par exemple, une cuve de 25 litres, car ce mélange mousse fortement et pourrait déborder.

On opère de préférence à la température de 20°. En hiver, on chauffera le local, au préalable, et on attendra que le feu soit éteint. Les vieilles cuves, baquets ou tonneaux en bois, de dimensions convenables, sont préférables aux vases en métal, bien que ces derniers ne soient pas détériorés par l'emploi de ces produits.

Pour éviter que le liquide ne vienne tacher le plancher s'il débordait, on placera les cuves sur des vieux chiffons ou des sacs. Du reste les taches s'enlèvent facilement par l'acide oxalique. Pour désinfecter, on ferme simplement les portes, les fenêtres ou toutes autres ouvertures. On ouvre largement les armoires, commodes, bahuts ; on défait les lits ; on suspend les tapis, couvertures, draps, de telle sorte que les vapeurs désinfectantes puissent pénétrer partout, et on verse, dans les ustensiles *ad hoc* contenant le permanganate de potassium cristallisé, la quantité nécessaire de formol dilué. Après 10 à 12 secondes, le gaz se dégage sous la forme d'un épais nuage qui se diffuse dans la pièce. Durant ces 10 secondes, on peut facilement sortir et fermer la porte. On laisse les vapeurs agir pendant six heures, temps suffisant pour que la désinfection soit complète. Il ne reste plus qu'à aérer ensuite jusqu'à disparition de l'odeur piquante du formol.

La tableau qui suit permet de se rendre compte de la quantité de produits à employer pour la désinfection des locaux.

Contenance en mètres cubes du local à désinfecter	**Quantités nécessaires de** MnO⁴K	Formol à 40 p. 100 dilué	**Contenance minimum** des vases à employer pour le mélange
50 m³	1 kgr.	2 litres	25 lit. de contenance
75 »	1 » 500	3 »	50 lit. ou 2 vases de 25 lit.
100 »	2 »	4 »	» » »
125 »	2 » 500	5 »	75 lit. ou 3 vases de 25 lit.
150 »	3 »	6 »	» » »
200 »	4 »	8 »	100 lit. ou 4 vases de 25 lit.
250 »	5 »	10 »	125 lit. ou 5 vases de 25 lit.

j) Ammoniaque. — On peut remplacer les procédés usuels de désinfection des pièces habitées (fumigation de formol ou de ses succédanés) par l'évaporation d'ammoniaque ordinaire placée simplement dans des vases plats (cuvettes de photographe, par exemple) au niveau du parquet. Le Dr Riegler, à l'Institut d'hygiène de Buda-Pesth, désinfecta ainsi une chambre de 100 mc³ avec 1 kilo d'ammoniaque ordinaire. Après une heure, il s'était évaporé 200 grammes de liquide, après 2 heures 250 grammes, après 3 heures 300 grammes, après 4 heures 350 grammes, après 5 heures 390 grammes et 450 grammes après huit heures. Naturellement la pièce doit être hermétiquement close.

Dans ces conditions, après examen de tissus imprégnés auparavant de microbes divers, on constate que les bacilles du choléra et de la typhoïde sont tués au bout de deux heures, la bactérie et les spores du charbon en moins de trois heures, le bacille diphtérique après huit heures. On voit que le procédé est efficace ; en outre il est peu coûteux ; enfin il n'altère ni les meubles, ni les tentures [1].

k) Soufre. — En brûlant, le soufre dégage le *double de son poids d'anhydride sulfureux* (SO^2). Ce dernier est un désinfectant assez actif qu'on emploie surtout pour la désinfection et la destruction des rats et des insectes dans les cales de navires, magasins, docks, caves, etc. Il a l'inconvénient de décolorer certains tissus et d'attaquer légèrement

1. *La Nature*, 1er février 1913.

certains métaux. Mais on peut protéger ceux-ci en les recouvrant simplement d'un léger enduit de vaseline ou d'un papier d'emballage.

La teneur de l'air en acide sulfureux dans un local à désinfecter se détermine au moyen d'une pipette graduée en centimètres cubes, à entonnoir, à deux robinets, de 250 centimètres cubes de capacité, qu'on a soin de bien dessécher tout d'abord.

On introduit dans cette pipette, au moyen d'un tube de caoutchouc portant une poire aspirante et foulante, de l'air prélevé dans la pièce. Après avoir balayé plusieurs fois l'air contenu dans la pipette on ferme les deux robinets. On verse dans l'entonnoir quelques centimètres cubes d'une solution d'iode dans l'iodure de potassium mélangée d'un peu d'empois d'amidon et étendue de 3 à 5 volumes d'eau distillée. On laisse pénétrer ce liquide par portions dans la pipette et on en introduit de nouveau en agitant jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de décoloration. 1 centimètre cube de liqueur d'iode à 12 gr. 7 par litre correspond à 3 mgr. 2 de SO^2.

Pour la désinfection des espaces clos par simple combustion du soufre, il faut employer *40 grammes de soufre en canons par mètre cube* et boucher soigneusement les ouvertures du local avec des bandes de papier gommé. Placer le récipient en fer ou en fonte contenant le soufre, au milieu de la pièce, sur une bassine pleine de sable.

l) Bichlorure de mercure (*sublimé*).

Sublimé corrosif	1 gr.
Eau.	1 litre
Acide chlorhydrique.	4 gr.

A rejeter pour la désinfection des crachats, des déjections et des linges, parce qu'il coagule les liquides albumineux et que le coagulum, formant une enveloppe protectrice aux microbes, soustrait ceux-ci à l'action désinfectante.

m) Eau oxygénée neutre. — L'eau oxygénée du commerce, à 10 ou 12 volumes, est toujours très acide. Pour éviter les inconvénients de cette acidité, il faut neutraliser l'eau oxygénée par l'eau de baryte jusqu'à réaction à peine alcaline. On réacidifie aussitôt très légèrement par une

seule goutte d'acide sulfurique ou phosphorique et on filtre pour enlever l'abondant précipité blanc du sulfate ou du phosphate de baryum.

Excellent antiseptique pour les plaies chirurgicales ou accidentelles infectées par des corps étrangers. On l'emploie pure (en attouchements) ou diluée dans 3 à 5 volumes d'eau stérile.

n) THYMOL-FORMOL. — Recommandable pour les crachoirs, lavabos, etc.. :

Teinture de quillaya.	50 gr.
Essence de thym.	50 gr.
Formol à 40 p. 100.	40 gr.

o) MÉLANGE DE JOLY CONTRE LES PIQURES DE MOUSTIQUES (antiseptique et anesthésiant local) :

Formol à 40 p. 100.	15 gr.
Xylol.	5 gr.
Acétone.	4 gr.
Baume de Canada.	1 gr.
Essence de girofle ou de bergamote. . . .	0 cc. 25

On touche les piqûres avec le pinceau ou un fragment de bois d'allumette trempé dans ce mélange et on laisse sécher.

Les personnes très sensibles peuvent se protéger très efficacement les parties du corps découvertes contre les piqûres de moustiques en saupoudrant ces parties plusieurs fois par jour avec un mélange de :

Trioxyméthylène.	1 gr.
Bicarbonate de soude.	20 gr.
Poudre de riz fine. (Parfumée au choix). . .	79 gr.

Ce mélange doit être soigneusement pulvérisé et tamisé.

p) LOTION SAVONNEUSE AU PÉTROLE POUR ÉLOIGNER LES TIQUES ET LES PUCES DE LA TOISON DES ANIMAUX.

Savon noir.	100 gr.
Pétrole.	50 gr.
Alcool à 95°.	50 cc.

Bien mélanger jusqu'à dissolution, puis ajouter peu à peu en agitant :

Eau.	1 litre

q) Poudre pour éloigner les poux du corps, les puces, punaises, etc., du linge de corps, des vêtements, des draps de lits, etc...

Soufre en fleur.	10 gr.
Trioxyméthylène.	5 gr.
Poudre de talc de Venise.	85 gr.

Broyer finement ensemble dans un mortier. Saupoudrer la peau sur toute la surface du corps au moins deux fois par jour avec ce mélange lorsqu'on doit fréquenter des endroits où la vermine abonde. On se préserve ainsi des maladies transmises par les insectes (*typhus exanthématique, fièvre récurrente, leishmanioses, peste bubonique*, etc...) et des puces-chiques (*Sarcopsylla penetrans*) par saupoudrage quotidien des pieds et de l'intérieur des chaussures.

Pour la destruction des ectoparasites (*Poux de la tête* ou du *pubis*, *Demodex*, etc...) on emploiera soit le vinaigre ou l'eau de Cologne contenant 2 grammes de sublimé par litre, soit le xylol en frictions, au tampon d'ouate. Le xylol est particulièrement recommandable, mais son application sur la peau, surtout lorsque celle-ci est excoriée, est un peu douloureuse. Il est avantageux alors de se servir du *mélange de Bodin* :

Xylol pur.	50 gr.
Alcool absolu.	25 gr.
Ether officinal	25 gr.

Pour la tête, le pubis, les aisselles, le xylol sera incorporé à de la vaseline :

Xylol.	L gtt.
Vaseline blanche.	50 gr.

La naphtaline en poudre, ou bien un mélange de naphtaline et de crésol en poudre, préservent très efficacement contre les poux du corps (saupoudrage du linge de corps).

TABLE ALPHABÉTIQUE

A

B

C

D

E

F

G

H

I

K

L

N

O

P

Q

R

S

T

Z



TABLE DES MATIÈRES

PREMIÈRE PARTIE

Techniques générales du laboratoire.

DEUXIÈME PARTIE

Expérimentation sur les animaux.

TROISIÈME PARTIE

Microbes de l'air, de l'eau et du sol.

QUATRIÈME PARTIE

Réactions humorales.

CINQUIÈME PARTIE

Techniques spéciales pour l'étude des maladies infectieuses de l'homme et des animaux.

SIXIÈME PARTIE

Préparation et titrage des vaccins et des sérums thérapeutiques.

SEPTIÈME PARTIE

Désinfection.

Poitiers. — Société française d'Imprimerie.



H. ROUVIÈRE
Professeur agrégé,
Chef des travaux anatomiques à la Faculté de médecine de Paris.

Anatomie Humaine

Descriptive et Topographique

Traité complet en deux volumes ne se vendant pas séparément et comprenant 1668 *pages*, 988 *figures en noir et en couleurs.*

Prix des 2 volumes.	Brochés	165 fr.
	Cartonnés tête rouge.	180 fr.

Ce prix est garanti sans majoration jusqu'au 31 Décembre 1924.

Il a été fait aussi une édition en 3 volumes cartonnés de cet ouvrage au prix de **190** *francs.*

Cette édition permet l'expédition par poste dans les pays où les envois sont limités à 3 kilos.

Par son contenu, sa méthode d'exposition, le soin apporté à sa présentation, ce nouveau traité d'Anatomie ne ressemble à aucun de ceux qui l'ont précédé — en France — et à l'étranger.

Toute commande de livres doit être accompagnée de son montant en une valeur sur Paris, augmenté de 10 % pour la France et de 15 % pour l'Étranger, pour frais de port et d'emballage.

CLINIQUE THÉRAPEUTIQUE CHIRURGICALE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Pierre DUVAL *J. Ch.* ROUX
Henri BÉCLÈRE

Etudes Médico-Radio-Chirurgicales sur le Duodénum

(1924). *Un volume de 264 pages avec 127 figures*. . . . **35 fr.**

Ces études sont l'exposé de l'enseignement fait à la clinique de Thérapeutique chirurgicale. Elles concernent des points nouveaux de la pathologie du duodénum sur lesquels des études nouvelles ont rajeuni nos connaissances. Ces études sont au nombre de dix :

I. *Le Duodénum dans la lithiase biliaire.* — II. *La Péri-duodénite sténosante essentielle.* — III. *La compression chronique de la troisième portion du duodénum par le pédicule mésentérique.* — IV. *La Duodéno-jéjunostomie.* — *Les signes radiologiques de l'ulcère du bulbe duodénal.* — VI. *L'intoxication dans la rétention duodénale.*

Sur chacun de ces sujets, les auteurs ont apporté leur expérience personnelle; les nombreuses radiographies qui illustrent le texte proviennent de malades qu'ils ont observés et suivis avant et après l'intervention chirurgicale. Ils ont pu ainsi établir une sémiologie à la fois clinique et radiologique, mieux préciser les indications chirurgicales et contrôler d'une façon plus exacte les résultats de l'opération.

Dr L. BROCQ

Cliniques Dermatologiques

Professées dans les Hôpitaux de Paris :

LA ROCHEFOUCAULD, BROCA, PASCAL-SAINT-LOUIS
ET A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

(1924). 1 *volume grand in-8° de* 740 *pages avec* 54 *figures.* **60** fr.

Le Docteur Brocq publie un recueil des principales « Leçons » qu'il a professées au lit du malade, toutes reposant sur l'observation, l'analyse et la pénétration du cas particulier. Ces *leçons* constituent un *ensemble* montrant, sous l'aspect le plus concret, la pathologie et la thérapeutique des affections cutanées.

L'auteur distingue deux groupes de dermatoses : celles dont l'étiologie est connue (*causées par des agents traumatiques, des agents toxiques ou des êtres vivants*) et celles dont on l'ignore, qu'il classe par leur aspect objectif, et dont il traite sous le titre de *réactions cutanées.* Toutes ces dermatoses reconnaissent des causes multiples, variables suivant les sujets et les prédispositions d'origine ancestrale, les prédispositions acquises à la suite d'intoxications accidentelles ou habituelles, de dysfonctionnement des divers organes producteurs de substances nécessaires à l'organisme. Ces conditions que nous appelons les *terrains individuels* ont une influence considérable dans l'un et l'autre groupe de dermatoses.

La « marque » de l'auteur se retrouve à chaque page, par la forme imagée, rapide, vivante, polémique même, qu'il a su donner à son exposition : une soixantaine des plus belles photographies des collections de Saint-Louis illustrent le texte.

NOUVEAU TRAITÉ DE MÉDECINE

PUBLIÉ SOUS LA DIRECTION DE MM. LES PROFESSEURS

G.-H. ROGER F. WIDAL P.-J. TEISSIER

Secrétaire de la Rédaction : *Marcel GARNIER*

22 FASCICULES grand in-8°, avec nombreuses figures dans le texte, en noir et en couleurs, et planches hors texte en couleurs, sous une élégante 1/2 reliure toile dos plat.

FASCICULE I. *Maladies infectieuses* (1920). 1 *volume de* 482 *pages avec* 55 *figures et* 3 *planches en couleurs, relié.* **35 fr.**

G.-H. ROGER. *Notions générales sur les Infections.* — A. SACQUÉPÉE. *Les Septicémies.* — G.-H. ROGER. *Les Streptococcies.* — P. MENETRIER et H. STÉVENIN. *Pneumococcie.* — P. MENETRIER et H. STÉVENIN. *Pneumonie.* — M. MACAIGNE. *Staphylococcie. Entérococcie. Psittacose. Infections à Tétragènes, à Cocco-bacilles, à Diplobacilles, à Protéus.* — A. VEILLON. *Infections putrides et gangreneuses.* — Ch. DOPTER. *Méningococcie.* — M. HUDELO. *Gonococcie.*

FASCICULE II. *Maladies infectieuses* (*suite*) (1922). 1 *vol. de* 765 *pages avec* 89 *figures et* 8 *planches en couleurs.* **50 fr.**

P.-J. TEISSIER et M. DUVOIR. *Scarlatine.* — P.-J. TEISSIER. *Rubéole. Quatrième maladie, Cinquième maladie. Rougeole. Varicelle. Variole.* — P.-J. TEISSIER et L. TANON. *Vaccine.* — PAUL RAVAUT. *Le Zona, les Herpès et les Fièvres herpétiques.* — P.-J. MENARD. *Fièvre aphteuse.* — JULES RENAUT. *Suette miliaire.* — G.-H. ROGER. *Charbon.* — CHARLES NICOLLE et E. CONSEIL. *Typhus exanthématique.* — P. LONDE. *Coqueluche.* — P.-J. TEISSIER et ESMEIN. *Oreillons.* — E.-C. AVIRAGNET, B. WEILL HALLÉ, P.-L. MARIE. *Diphtérie* — J. CAMUS et J.-J. GOURNAY. *Tétanos.* — M.-H. BARBIER. *Le Rhumatisme articulaire.* — H. DE BRUN. *Dengue, Fièvre de Papataci.*

FASCICULE III. ***Maladies infectieuses*** (suite). **2e édition** (1924). 1 *vol.* 608 *pages,* 62 *fig. et* 4 *pl. en couleurs, relié.* **45** fr.

F. Widal, A. Lemierre et P. Abrami. *Fièvres typhoïde et paratyphoïdes.* — F. Widal et A. Lemierre. *Colibacillose.* — Ch. Dopter. *Dysenteries.* — M.-A. Ruffer et Milton Crendiropoulo. *Choléra.* — Sacquépée. *Botulisme. Fièvre de Malte.* — R.-P. Strong. *Fièvres de tranchées.* — P. Menetrier et H. Stévenin. *Grippe.* — E. Sacquépée et Garcin. *Peste.* Azevedo Sodré. *Fièvre Jaune.*

FASCICULE IV. ***Maladies infectieuses et parasitaires*** (1922). 1 *vol. de* 709 *pages avec* 134 *figures dans le texte et* 5 *planches en couleurs, relié.* . . . . **40** fr.

Ch. Dopter. *Maladie de Heine-Medin.* — May. *Encéphalite léthargique.* — Ferré. *Rage.* — H. Roger. *Tuberculose en général.* — P. Courmont. *Septicémies tuberculeuses.* — H. Roger. *Pseudo-tuberculoses bacillaires.* — P. Courmont et A. Dufourt. *Morve.* — Perrin. *Lèpre.* — Guiart. *Verruga.* — Laederich. *Actinomycose. Aspergillose.* — Langeron. *Oosporoses. Mycétomes. Sporotrichoses. Blastomycoses.* — Brumpt. *Spirochétoses, en général.* — Nicolas. *Syphilis.*

FASCICULE V. ***Tome I. Maladies infectieuses et parasitaires*** (*fin*). — **2e édition** (1924). *Un volume de* 452 *pages avec* 196 *figures et* 3 *planches en couleurs.* . . . **40** fr.

R. Demanche. *Chancre simple. Granulome des organes génitaux.* — L. Bory. *Chancre et bubon poradéniques.* — Ch. Joyeux. *Goundou, Pian.* — Charles Nicolle et Conseil. *Fièvres récurrentes.* — D. Thibaut. *Sodoku.* — H. Vincent et J. Rieux. *Le paludisme. La fièvre bilieuse hémoglobinurique.* — Charles Nicolle. *Bouton d'Orient.* — Ch. Joyeux. *Trichinose.* — J. Guiart. *Filariose, Strongylose, Distomatose, Coccidiose, Sarcosporidiose.* — F. Dévé. *Echinococcose, Cysticercose.* — E. Brumpt. *Les Trypanosomoses humaines, les Bilharzioses. Erythème polymorphe et érythème noueux* par M. Garnier et J. Cathala.

Tome II. Le Cancer par Gustave Roussy et Maurice Wolf. **2e édition** (1925). *Un volume avec figures et planches en couleurs* . . . . *Sous presse*

FASCICULE VI. ***Intoxications.*** 1 *vol. de* 506 *pages avec* 23 *fig. dans le texte et* 3 *planches en couleurs, relié.*

2e édition. . . . . *En préparation*

FASCICULE VII. ***Avitaminoses. Maladies par agents physiques. Troubles de la nutrition. 2e Edition*** (1924). 1 *volume de* 584 *pages avec* 36 *figures, relié* . . . . **40 fr.**

G.-H. ROGER. *Vitamines et Avitaminoses.* — E.-P. BENOIT. *Scorbut.* — G. ARAOZ ALFARO. *Scorbut infantile* — ALDO PERRONCITO. *La Pellagre.* — E. SACQUÉPÉE. *Béribéri.* — A. CALMETTE. *L'Intoxication par les venins; la sérothérapie.* — PH. PAGNIEZ. *Maladies déterminées par l'Anaphylaxie.* — PAUL COURMONT. *Maladie Sérique.* — J.-P. LANGLOIS et LÉON BINET. *Maladies par agents physiques.* — PAUL LE GENDRE. *Troubles et maladies de la nutrition.*

FASCICULE VIII. ***Affections des glandes endocrines. Troubles du développement.*** (1924). 1 *vol. de* 456 *pages avec* 107 *figures et* 1 *planche en couleurs, relié*. . . . . . . **40 fr.**

PAGNIEZ. *Troubles du développement général.* — SÉZARY. *Pathologie de l'hypophyse.* — SOUQUES. *Acromégalie.* — SÉZARY. *Pathologie de la glande pinéale.* — APERT. *Pathologie de la glande thyroïde.* — SOUQUES. *Myxœdème et goitre exophtalmique.* — HARVIER. *Pathologie des parathyroïdes.* — BORY. *Pathologie du thymus.* — JOSUÉ. *Pathologie des Capsules surrénales.* — APERT. *Insuffisance testiculaire et ovarienne.* CLAUDE et BAUDOIN. *Syndromes pluriglandulaires.*

FASCICULE XI. ***Pathologie de l'appareil respiratoire.*** (Nez, Larynx, Trachée, Bronches, Poumons). — 1923. 1 *vol. de* 636 *pages avec* 87 *figures et* 5 *planches en couleurs, relié*. **45 fr.**

F. BEZANÇON et I. DE JONG. *Séiologie de l'appareil respiratoire.* — BOURGEOIS. *Pathologie du nez et du larynx.* — F. BEZANÇON et I. de JONG. *Pathologie de la trachée et des bronches. Asthme.* — HUTINEL et PAISSEAU. *Bronchopneumonie.* — HARVIER. *Pneumonoconiose, Syphilis pulmonaire, et autres affections du poumon.* — RIBADEAU-DUMAS. *Kystes hydatiques du poumon et de la plèvre, Cancer pleuropulmonaire.*

FASCICULE XII. ***Pathologie de l'Appareil respiratoire*** (suite), (1923). 1 *vol. de* 596 *p.*, 56 *fig. et* 10 *pl. relié* **45 fr.**

M. LETULLE et P. HALBRON, *La Tuberculose pulmonaire.* — *Pseudo-Tuberculoses Pulmonaires.* — HARVIER et MARCEL PINARD. *Pathologie de la Plèvre.* — L. RIBADEAU-DUMAS. *Pathologie du Médiastin et Adénopathies Trachéo-Bronchiques.*

FASCICULE XIII. ***Pathologie de l'Appareil digestif*** (Bouche, Pharynx, Œsophage, Estomac) (1923). — 1 *volume de* 808 *pages avec* 119 *figures et* 4 *planches en couleurs, relié.* **50 fr.**

L. Babonneix et H. Darré. *Pathologie de la Bouche. — Path. du Pharynx.* — R. Bensaude et L. Rivet. *Path. de l'Œsophage.* — P. Le Noir et E. Agasse Lafont. *Path. de l'Estomac.*

FASCICULE XIV. ***Pathologie de l'Appareil digestif*** (Intestin) (1924). 1 *vol. de* 580 *pages avec* 168 *figures et* 7 *planches en couleurs, relié*. **45 fr.**

Trémolières et Louis Caussade. *Path. de l'intestin.* — Nobécourt. *Affections gastro-intestinales des Nourrissons.* — Joyeux. *Vers intestinaux.* — E. Perroncito. *Ankylostomiase.* — Gaultier. *Examen des fèces.* — R. Bensaude. *Pathologie du rectum et du colon terminal.*

FASCICULE XV. ***Affections des glandes salivaires, du pancréas et du péritoine*** (1923). 1 *volume de* 564 *pages avec* 133 *figures et* 2 *planches en couleurs, relié* . . . . **40 fr.**

E. Parmentier et E. Chabrol. *Pathologie des glandes salivaires. — du Pancréas.* — Paul Londe. *Affections aiguës du Péritoine.* — Macaigne. *Affections chroniques du péritoine.* — F. Dévé. *Kystes hydatiques du péritoine.*

FASCICULE XXII (et dernier). ***Pathologie des Muscles, Os et Articulations.*** — (1924). 1 *volume de* 560 *pages avec* 209 *figures et* 2 *planches en couleurs, relié*. . . . . . . **45 fr.**

Thiers. *Affections des muscles.* — Léri. *Maladies des os* — O. Crouzon. *Distrophies osseuses congénitales.* — Spillmann. *Rachitisme.* — Spillmann et J. Benech. *Ostéomalacie.* — Souques. *Achondroplasie.* — Lesné et J. Langle. *Pseudo-rhumatismes infectieux et toxiques, Syphilis et tuberculose articulaires.* — Marinesco. *Rhumatisme chronique.*

En préparation :

FASCICULE IX. ***Pathologie des Organes hématopoïétiques, du Système lymphatique et du Sang.***

FASCICULE X. ***Pathologie de l'Appareil circulatoire.***

FASCICULE XVI. ***Pathologie du Foie.***

FASCICULE XVII. ***Pathologie des Reins.***

FASCICULES XVIII à XXI. ***Path. du système nerveux.***

Dr A. MARTINET

Diagnostic Clinique

avec la collaboration des Docteurs :

DESI OSSES, G. LAURENS, Léon MEUNIER, LUTIER
SAINT-CÈNE, TERSON

4e Édition (1922). 1 *volume grand in-8 de 1040 pages avec une riche illustration de 892 figures dont 31 en couleurs.*

Broché . . . . **55 fr.** : Cartonné. . . . . . **60 fr.**

Dr A. MARTINET

Thérapeutique Clinique

avec la collaboration des Docteurs :

DESI OSSES, G. LAURENS, Léon MEUNIER, LOMON,
LUTIER, MARTINGAY, MOUGEOT, POIX,
SAINT-CÈNE, SÉGARD et TERSON

2e Édition (1923). 1 *volume in-8° de 1510 pages avec 351 figures dans le texte et tableaux.*

Broché . . . . **65 fr.** : Cartonné. . . . . . **70 fr.**

Les chapitres se rapportant à la *colloïdothérapie*, aux *intoxications*, au traitement usuel des *affections auriculaires*, des *affections oculaires*, à la *technique des injections intratrachéales* et *injections intracardiaques*, à la *syphilis*, y ont été très augmentés ; le chapitre consacré aux sanatoria et celui consacré aux *affections de l'appareil respiratoire* ont été refondus.

Dr Gaston LYON
Ancien Chef de Clinique médicale à la Faculté de Médecine de Paris.

Traité élémentaire de Clinique Thérapeutique

11e Edition (1924). 1 *volume grand in-8° de* XIV-1408 *pages*,
Broché. **70** fr. *Cartonné.* **85** fr.

Dix éditions de ce traité, et plusieurs traductions ont déjà paru, sa réputation a été consacrée par d'innombrables praticiens français et étrangers, il n'a pas cessé d'être depuis plusieurs années un ouvrage médical de premier plan.

Le Dr Lyon a maintenu ce succès persistant en adaptant à chaque édition son traité aux méthodes nouvelles, en vulgarisant les récents procédés thérapeutiques et leurs techniques.

Tout en réduisant le volume de l'ouvrage d'environ 460 pages, le Dr Lyon a introduit dans cette édition un nombre considérable d'additions concernant notamment : *les arythmies*, *les maladies du sympathique*, *les maladies par le choc*, *le traitement de la syphilis par le bismuth*, *celui du diabète par l'insuline*, etc.

La thérapeutique s'orientant de plus en plus vers l'emploi des *vaccins*, *des sérums*, *des produits opothérapeutiques*, en un mot, vers les médications d'ordre biologique, le Dr Lyon met davantage encore à la portée de tous les méthodes et techniques que cette orientation fait naître : récolter des *crachats*, des *exsudats*, du *sang*, du *liquide céphalo-rachidien* ; *injections veineuses de sérums organiques*, des *arséno-benzols*, de *l'ouabaïne*, pratique de l'*auto-hémothérapie* des sérums *anti-diphtériques*, du *pneumothorax artificiel*, etc.

CH. ACHARD

Professeur de clinique médicale à la Faculté de Médecine de Paris
Membre de l'Académie de Médecine.

Clinique médicale

de l'hôpital Beaujon

(1923). 1 *volume de* 460 *pages avec* 90 *figures.* . . . . . **25 fr.**

Septicémie Staphylococcique — Septicémie Entérococcique à forme de purpura rhumatoïde — Infection puerpérale — Contagion de scarlatine méconnue — Diphtérie associée — Tétanos. Formes cliniques, Pathogénie, Sérothérapie — *Méningites purulentes à pneumocoques — La Vaccination contre les maladies typhoïdes — Sclérose en plaques — Hémianopsies — Tabes supérieur — Maladie de Recklinghausen — Le Syndrome Basedowien (5 leçons) — Virilisme pilaire et diabète — Spondylose Rhizomélique, etc., etc.*

CH. ACHARD

Aperçu de la Physiologie et de la Pathologie générales du Système Lacunaire

(1924). 1 *volume de* 126 *pages avec* 29 *figures.* . . . . . **10 fr.**

PAR *système lacunaire*, l'auteur entend le vaste assemblage de cavités discontinues où se trouve enclose la plus grande partie du liquide de l'organisme.

L'auteur étudie la formation de ces sérosités, leur rôle et celui de la membrane, les échanges, la stabilité physico-chimique de ce liquide. Il indique les modifications dues à l'état morbide et à l'inflammation ; expose des considérations thérapeutiques.

G. H. ROGER
Doyen de la Faculté de Paris,
Professeur de Pathologie expérimentale et comparée,
Membre de l'Académie de Médecine.

Questions actuelles de Biologie Médicale

(1924). 1 *volume de* 196 *pages avec* 49 *figures* . . . . . **16** fr.

I. Les fonctions internes du poumon, action du poumon sur les matières grasses. — II. Quelques faits relatifs à la physiologie normale et pathologique du poumon. — III. Action cardio-vasculaire de quelques extraits d'organes. — IV. Recherches sur les caspules surrénales. — V. Action du foie sur les poisons. — VI. Recherches sur les ferments. — VII. Le rôle de la bile.

J. KUNSTLER
Professeur d'Anatomie comparée
et d'Embryogénie,
à la Faculté des Sciences de Bordeaux.

Fred. PRÉVOST
Ancien Elève
de l'École Normale supérieure,
Agrégé des Sciences naturelles

La Matière vivante

Organisations et différenciations — Origines de la vie — Colloïdes et mitochondries —

(1924). 1 *volume de* 234 *pages avec* 53 *figures*. . . . . **18** fr.

DISCUSSION des théories les plus récentes sur la structure de la matière vivante éclairée par les recherches personnelles de l'auteur. Les auteurs traitent des théories de la *matière vivante, de sa constitution moléculaire*, des *origines de la vie*, du *sarcode*; des *sphérules*, des *organisations*, *adaptations* et *contenus vacuoloïdaires* et d'une esquisse historique.

La deuxième partie est un exposé technique. Elle comprend l'étude de la structure vacuoloïdaire, des organisations sphérulaires, de points de vue spéciaux et des mitochondries.

C. LEVADITI

Le Bismuth

dans le traitement de la

Syphilis

(1924). 1 *vol. de* 316 *pages avec* 31 *fig. et* 1 *pl. hors texte.* **25** fr.

Ce livre a été écrit pour le praticien. Il y trouvera et les résultats fournis par l'expérience sur l'animal et des faits précis de clinique pouvant lui servir de modèle et entretenir sa conviction.

Des notions de chimie, de toxicologie, un résumé et des données expérimentales acquises et surtout les impressions des syphiligraphes qui ont étudié le problème au lit du malade lui fourniront une documentation complète sur la bismuthothérapie antisyphilitique.

Paul LE GENDRE

Médecin honoraire des Hôpitaux de Paris,
Membre de l'Académie de Médecine.

Un Médecin Philosophe

Charles Bouchard

son œuvre et son temps

1 *volume de* 526 *pages avec un portrait*. . . . . **30** fr.

Le livre est plus qu'*une* monographie. Bien que l'auteur n'ait pas eu la prétention d'écrire l'histoire de la médecine en France pendant les soixante années qui correspondent à la vie médicale de Charles Bouchard, il retrace l'histoire de son milieu et montre le rôle important qu'il a joué par ses découvertes et ses doctrines.

P. NOBÉCOURT
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris.
Médecin de l'hôpital des Enfants Malades.

Clinique Médicale des Enfants

Affection de l'Appareil respiratoire

(1924). 1 *volume de* 348 *pages avec* 52 *figures* . . . . . **22** fr.

C'EST un livre de *science médicale appliquée.* Le clinicien qu'est le professeur Nobécourt met en scène le malade ; il réveille son histoire, l'observe, l'examine, l'analyse, expose les méthodes mises en œuvre pour porter un diagnostic, les difficultés rencontrées, les hésitations, les traitements institués. Enfin, il tire du fait particulier les enseignements d'ordre général qu'il comporte.

Le médecin trouvera dans ce livre simple et clair des idées nettes et précises sur la plupart des cas graves, qu'il est appelé à rencontrer.

Paul SOLLIER
Professeur à l'Institut des Hautes Études de Belgique.

Paul COURBON
Médecin chef de l'Asile de Stéphansfeld.

Pratique sémiologique des Maladies mentales

Guide de l'Etudiant et du Praticien

(1924). 1 *volume de* 458 *pages avec* 87 *figures originales*; *collection du Médecin Praticien* . . . . **20** fr.

CE livre permet sans notions préalables de médecine mentale à l'étudiant ou au praticien mis en face d'un aliéné, de savoir comment l'aborder, l'examiner, l'interroger ; dans quelle catégorie nosologique le placer, et quelles mesures prendre à son égard. Il constitue une sémiologie pratique et une mise au point de la médecine mentale actuelle.

P. POIRIER — A. CHARPY

Traité d'Anatomie Humaine

NOUVELLE ÉDITION ENTIÈREMENT REFONDUE
par **A. NICOLAS**
Professeur d'Anatomie à la Faculté de Médecine de Paris.

Tome V - Fasc. I **Organes Génito-Urinaires**

(1923). 1 *volume in-8 de 662 pages avec 348 figures* . . **65** fr.

Développement : *A. Weber*. Le rein et les canaux excréteurs : *A. Augier* ; Vessie ; Urètre ; Prostate ; Verge ; Urètre de la femme ; Périnée : *Paul Delbet*. Appareil génital de l'homme : *O. Pasteau*. Organes génitaux et périnée de la femme : *A Hovelacque*.

PRÉCIS DE TECHNIQUE OPÉRATOIRE
PAR LES PROSECTEURS DE LA FACULTÉ DE PARIS

Nouvelle Série

Pierre DUVAL — J. GATELLIER

Chirurgie de l'Appareil Urinaire et de l'Appareil Génital de l'Homme

6e Édition (1924). 1 *volume de 284 pages avec 310 figures.*
Broché . . . . **12** fr. ; Cartonné . . . . **15** fr.

V. VEAU et F. D'ALLAINES

Pratique courante et Chirurgie d'urgence

7e Edition (1924). 1 *volume de 302 pages avec 320 figures.*
Broché . . . . **12** fr. ; Cartonné . . . . **15** fr.

Wells P. EAGLETON
M. D. Newark — New-Jersey.

Abcès de l'Encéphale

Pathologie Chirurgicale et Technique Opératoire

(1924). 1 *volume de* 340 *pages avec* 40 *figures*. . . . . **30** fr.

L'OUVRAGE est divisé en trois parties. La première renferme les considérations générales de la chirurgie intra-cranienne : *Opération*, *Anesthésie*, *Technique*, *Instruments*, *Position du sujet*, *Suture*, *Hémostase*, etc.

La deuxième partie est consacrée à la *Pathologie chirurgicale* et à la *Technique opératoire de l'abcès du cerveau.*

Enfin la troisième est réservée au *Diagnostic chirurgical.* Pour chaque catégorie, l'auteur indique les *symptômes*, les *manifestations*, les *modifications* qui peuvent être l'indice certain pour le chirurgien.

P. GUIBAL (de Béziers)
Ex-interne des hôpitaux de Paris.

Traitement Chirurgical de la Dilatation Bronchique

(1924). 1 *volume de* 174 *pages avec* 31 *figures*. . . . . . **10** fr.

L'AUTEUR rappelle les formes cliniques de la dilatation bronchique pour établir la démarcation entre les formes « médicales » et les formes « chirurgicales » ; il met en évidence la bronchectasie chronique invétérée, contre laquelle l'action du chirurgien est particulièrement efficace.

Sont exposées l'évolution clinique de la bronchectasie chronique et l'impuissance du traitement médical.

L'exposé des méthodes chirurgicales avec, pour chacune d'elles, les indications techniques et résultats.

Georges LAURENS

Chirurgie de l'Oreille du Nez, du Pharynx et du Larynx

2e Édition (1924). 1 *volume grand in-8° de* 1048 *pages avec* 783 *figures dans le texte, relié* . . . . **100** fr

Le plan du traité a été ordonné selon le type suivant. Chaque opération est décrite avec *ses indications*, *sa technique et ses suites*, parfois même si le sujet l'exige quelques notions d'anatomie topographique.

L'auteur précise pour chaque cas ses indications, contre-indications et conditions défavorables.

La technique est l'objet des détails les plus minutieux, le spécialiste devant souvent recourir à la voie externe et agir en véritable chirurgien et les interventions portant soit sur les cavités osseuses, anfractueuses et profondes, soit sur des muqueuses sensibles et vasculaires.

Il faut réaliser la perfection, s'il est possible dans l'éclairage, l'anesthésie, et l'hémostase du champ opératoire. L'auteur décrit largement les modes d'anesthésie : *par badigeonnage*, *par infiltration et par voie tronculaire*; il multiplie les schémas et indique les manœuvres.

Il n'est pas de spécialité où l'acte opératoire n'entraîne comme corollaire des soins consécutifs aussi importants qu'en oto-laryngologie. L'auteur décrit les *incidents*, *accidents*, *suites normales* ou *atypiques*, *complications et résultats définitifs* des interventions pratiquées *sur le rocher, la face et le larynx*.

Dr POULARD
Médecin des Hôpitaux de Paris.

Traité d'Ophtalmologie

(1923). 2 *volumes grand in-8 formant ensemble* 1458 *pages avec* 710 *figures, et* 3 *planches hors texte en couleurs. — Reliés pleine toile fers spéciaux*. . . . . **120** fr.

C'est un traité d'ophtalmologie clinique complet dans lequel l'élève et le praticien peuvent trouver rapidement ce qui les intéresse dans leur pratique.

De parti pris, l'auteur a éliminé ce qui n'offre qu'un intérêt historique, les notions maintenant controuvées, les médications abandonnés, les opérations sans valeur ou impraticables.

L'anatomie pathologique, qui mérite une place dans des livres spéciaux, n'est point ici étudiée en détail, mais les lésions sont décrites dans la mesure où elles intéressent la clinique; on y trouvera la description des traitements chirurgicaux; la technique opératoire y est traitée avec le plus grand soin, spécialement celle des opérations réparatrices. — La clinique, les procédés d'exploration, la thérapeutique sont bien exposés.

L'auteur a donné une grande importance aux illustrations pour qu'on puisse saisir clairement et d'un coup d'œil ce que des explications longues ne parviennent pas à faire comprendre. De plus, à côté des dessins, il a placé le plus souvent possible des photographies documentaires.

Lt-Cl ELLIOT R. H.
Médecin-chef Honoraire
de l'hôpital Ophtalmologique de Madras.

Ophtalmologie Tropicale

Traduction française par

Dr COUTELA
Ophtalmologiste
des Hôpitaux de Paris

Dr MORRAS
Ophtalmologiste
de l'Hôpital Marie-Feuillet à Rabat

(1922). 1 *vol. in-8° de* 360 *pages avec* 7 *pl. et* 117 *fig.* **30 fr.**

F. de LAPERSONNE
Professeur de Clinique
Ophtalmologique.

A. CANTONNET
Ophtalmologiste
de l'Hôpital Cochin.

Manuel de
Neurologie oculaire

2e Edition (1923). 1 *volume de* 416 *pages avec* 113 *figures et* 4 *planches en couleurs* . . . . **20 fr.**

Les auteurs décrivent les différents appareils nerveux de l'œil, les symptômes de leurs lésions et la sémiologie de ces symptômes. Puis ils passent en revue les troubles oculaires dans les différentes maladies.

Dans cette 2e partie, ils ont créé dans cette édition de nouveaux chapitres pour exposer les connaissances récentes sur les lésions *du grand sympathique, les troubles parkinsonniens, les syndromes hypophysaires, l'encéphalite léthargique, les affections neuro-oculaires familiales, la rétinite azotémique, les avitaminoses*, etc.

Charles H. MAY

Manuel des
Maladies de l'Œil

à l'usage des Étudiants et des Praticiens

Traduit et annoté par P. BOUIN
Professeur à la Faculté de Médecine de Nancy.

4e Edition française. (1923); d'après la 10e édition américaine

1 *volume de* 452 *pages avec* 160 *figures en noir et en couleurs et* 22 *planches hors texte*. . . . . **30 fr.**

Félix TERRIEN

Professeur agrégé à la Faculté de Médecine de Paris,
Ophtalmologiste de l'Hôpital Beaujon.

Sémiologie Oculaire

La Calotte Cornéo-Sclérale

Anatomie — Physiologie — Pathologie

(1923). 1 *volume de* 260 *pages avec* 144 *figures*. . . . **25 fr.**

POUR le spécialiste et pour le médecin général, la calotte cornéo-sclérale est la plus directement accessible. Son examen facile, ses réactions fréquentes permettent de dépister une syphilis, une tuberculose, etc., et donnent souvent des résultats remarquables.

Félix TERRIEN

Sémiologie Oculaire

Le Diaphragme irido-ciliaire

Anatomie — Physiologie — Pathologie

(1924). 1 *volume de* 240 *pages avec* 126 *figures*. . . . **25 fr.**

DESCRIPTION anatomo-physiologique, du point de vue clinique, fonction mécanique du diaphragme et fonction motrice, fonctions de nutrition. Etude sur la pupille, sur la structure et la réfraction du globe.

Les inflammations, les irritis blennorragiques, méningococciques et la valeur de la sérothérapie sont ensuite traitées.

L'ouvrage se termine par la sémiologie des contusions du diaphragme irido-ciliaire, par les tumeurs, les malformations de cette région et par l'étude des variations de la tension oculaire.

Félix TERRIEN
Professeur agrégé à la Faculté
de Médecine

G. COUSIN
Chef de laboratoire d'Ophtalmologie
à la Faculté de Médecine

Affections de l'Œil

en médecine générale

Diagnostic et Traitement

(1924). 1 *volume de* 510 *pages avec* 128 *figures*. . . . . **40** fr.

A mesure que nous avons appris à mieux connaître l'importance et la fréquence des lésions du globe oculaire au cours des affections générales, l'examen de l'œil est devenu le complément de toute investigation clinique.

Les auteurs ont eu ce double but — rappeler au praticien les complications oculaires susceptibles d'apparaître au cours d'une affection générale, lui permettre de les reconnaître et même de soupçonner, par leur apparition, telle maladie demeurée méconnue; — grouper pour le spécialiste dans une étude d'ensemble les manifestations observées au cours des lésions des différents appareils : circulatoire, rénal, nerveux, etc.

Le plan de l'ouvrage répond à ces desiderata.

De nombreuses figures, claires et précises, ajoutent à l'intelligence du texte.

F. TERRIEN

Chirurgie de l'Œil

et de ses annexes

2e Édition (1921). 1 *vol. de* 620 *pages avec* 495 *figures*. . **50** fr.

COLLECTION DE PRÉCIS MÉDICAUX

Précis de Pathologie Médicale

PAR

F. BEZANÇON, MARCEL LABBÉ, LÉON BERNARD, J.-A. SICARD, A. CLERC, P. EMILE WEILL, PHILIBERT, S.-I. DE JONG, A. SEZARY, CH. FOIX, PASTEUR VALLERY-RADOT, G. VITRY, MARCEL BLOCH

Complet en 6 volumes. Broché. **150** fr. : *Cartonné* **180** fr.
Chaque vol. séparément. Broché. **25** fr. : *Cartonné* **30** fr.

TOMES PARUS

TOME II. **Maladies de l'appareil respiratoire**, par F. BEZANÇON, professeur à la Faculté de Médecine de Paris, médecin de l'hôpital Boucicaut et S.-I. DE JONG, médecin des hôpitaux de Paris.

(1923). 1 *volume de* 566 *pages avec* 85 *figures et* 2 *pl. en couleurs.*

TOME IV. **Maladies du sang et des organes hématopoïétiques**. par P. EMILE WEILL, médecin de l'hôpital Tenon, et MARCEL BLOCH, chef de Laboratoire à la Faculté de Paris.

Maladies des reins, par PASTEUR VALLERY-RADOT, médecin des Hôpitaux de Paris.

(1922). 1 *volume de* 628 *pages,* 150 *figures,* 4 *pl. en couleurs.*

TOME V. **Maladies de l'appareil digestif et de la nutrition,** par MARCEL LABBÉ, professeur à la Faculté de Médecine de Paris, médecin de l'hôpital de la Charité et G. VITRY, ancien chef de Clinique à la Faculté de Médecine de Paris.

(1922). 1 *volume de* 790 *pages,* 316 *figures,* 2 *pl. en couleurs.*

AUTRES TOMES A PARAITRE

Tome I. Maladies Infectieuses et Intoxications par F. Bezançon, Philibert, Léon Bernard.
Tome III. Maladies du cœur et des vaisseaux par M. A. Clerc.
Tome VI. Maladies du Système nerveux par M. Sicard et Ch. Foix. Glandes endocrines par A. Sezary.

COLLECTION DE PRÉCIS MÉDICAUX

Précis de Pathologie Chirurgicale

PAR MM.

P. BÉGOUIN, H. BOURGEOIS, P. DUVAL, GOSSET, E. JEANBRAU, LECÈNE LENORMANT, R. PROUST, TIXIER

QUATRIÈME ÉDITION, REVUE ET AUGMENTÉE

Ouvrage complet en 4 volumes.

TOME I. — Pathologie chirurgicale générale, Maladies générales, Tissus, Crâne et Rachis. (1924). 1 *volume* 1173 *pages et* 387 *fig.*

TOME II. — Tête, Cou, Thorax. (1924). 1 *volume* 1128 *pages avec* 320 *figures.*

TOME III. — Glandes mammaires, Abdomen, Appareil génital de l'homme, (1924). 1 *volume de* 953 *pages avec* 387 *figures.*

TOME IV. — Appareil urinaire, Gynécologie, Fractures et luxations. Affections des membres, (1924). 1 *volume de* 1256 *pages avec* 384 *figures.*

Chaque volume . . . . *Broché* **30** fr. *Cartonné* . . . **36** fr.

H. ROUVIÈRE

Professeur agrégé. Chef des travaux anatomiques à la Faculté de Médecine.

Précis d'Anatomie et Dissection

Tome I. — *3e Édition* : Tête, cou, membre supérieur.

Tome II. — *3e Édition* : Thorax, abdomen, bassin, membre inférieur.

(1920). *Chaque volume* . . . . *Broché* **25** fr. *Cartonné* **30** fr.

POIRIER

Professeur d'Anatomie à la Faculté.

BAUMGARTNER

Ancien Prosecteur.

Précis de Dissection

4e Édition (1919). 1 volume de XXIII-360 *pages*, avec 241 *figures.*

Broché . . . . . . **10** fr. *Cartonné* . . . . . . **12** fr.

COLLECTION DE PRÉCIS MÉDICAUX

Aug. BROCA

Professeur d'opérations et appareils à la Faculté de Médecine de Paris.

Précis de Médecine Opératoire

2e *Édition* (1920). 510 *fig. Broché.* **14** fr. *Cartonné.* . **18** fr.

G.-H. ROGER

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris.

Introduction à l'Etude de la Médecine

7e *Édition* (1921). 1 *vol de* 812 *p. Broché.* **25** fr. *Cartonné.* **30** fr.

G. WEISS

Professeur à la Faculté de Médecine de Strasbourg.

Précis de Physique biologique

5e *Édition* (1923). 576 *pages*, 584 *figures.*

Broché . . . . . . **18** fr. *Cartonné* . . . . . . **22** fr.

M. ARTHUS

Professeur de Physiologie à l'Université de Lausanne.

Précis de Physiologie

6e *Édition* (1920). 1 *vol. de* 976 *pages et* 326 *figures.*

Broché . . . . . . **25** fr. *Cartonné* . . . . . . **30** fr.

M. ARTHUS

Précis de Chimie physiologique

10e *Édition* (1924). 1 *vol. de* 452 *pages*, 115 *figures, et* 5 *planches.*

Broché . . . . . . **22** fr. *Cartonné* . . . . . . **28** fr.

M. ARTHUS

Précis de Physiologie Microbienne

(1921). 1 *vol. de* 408 *pages. Broché.* **17** fr. *Cartonné.* **22** fr.

M. LAMBLING

Professeur a la Faculté de Médecine de Lille.

Précis de Biochimie

3e *Edition* (1921). 1 *vol. de* 723 *pages. Br.* **25** fr. *Cartonné.* **30** fr.

COLLECTION DE PRÉCIS MÉDICAUX

NOBÉCOURT
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris.

Précis de Médecine des Enfants

4e Édition (1921). 1 *volume de* 1024 *pages avec* 229 *figures.*
Broché . . . . . . **30** fr. *Cartonné* . . . . . . **36** fr.

V. MORAX

Précis d'Ophtalmologie

3e Édition (1921). 1 *volume de* 870 *pages avec* 450 *figures et* 4 *planches en couleurs.*
Broché . . . . . . **34** fr. *Cartonné* . . . . . . **40** fr.

L. OMBRÉDANNE
Professeur agrégé à la Faculté de Médecine de Paris.

Précis clinique et Opératoire de Chirurgie Infantile

(1923). 1 *volume de* 1140 *pages avec* 584 *figures.*
Broché . . . . . . **42** fr. *Cartonné* . . . . . . **48** fr.

J. DARIER
Médecin honoraire de l'hôpital Saint-Louis.

Précis de Dermatologie

3e Édition (1923). 1 volume de 996 *pages,* 211 *figures et planches.*
Broché . . . . . . **55** fr. *Cartonné* . . . . . . **60** fr.

A. LACASSAGNE
Professeur honoraire de médecine légale à l'Université de Lyon.

Étienne MARTIN
Professeur de médecine légale à la Faculté de Médecine de Lyon.

Précis de Médecine Légale

3e Édition (1921). 1 *volume de* 752 *pages avec* 115 *figures.*
Broché . . . . . . **27** fr. *Cartonné* . . . . . . **32** fr.

ÉT. MARTIN

Précis de Déontologie et de Médecine professionnelle

2e Édition (1923). 1 *volume de* 344 *pages.*
Broché . . . . . . **13** fr. *Cartonné* . . . . . . **15** fr.

PRÉCIS DE TECHNIQUE

G. ROUSSY
Professeur agrégé,
Chef des Travaux d'Anatomie pathologique

I. BERTRAND
Moniteur des Travaux pratiques d'anatomie pathologique.

Travaux pratiques d'Anatomie Pathologique

en quatorze séances

3e Édition (1924). 1 *volume de* 264 *pages avec* 124 *planches.* **12** fr.

H. BULLIARD
Préparateur d'Histologie à la Faculté de Paris.

Ch. CHAMPY
Professeur agrégé à la Faculté de Paris,

Abrégé d'Histologie

3e Édition (1923). 1 *volume de* 356 *pages avec* 207 *figures* 6 *planches en couleurs* . . . . **15** fr.

L. LANDOUZY — LÉON BERNARD

Eléments d'Anatomie et de Physiologie Médicales

PUBLIÉS SOUS LA DIRECTION DE *Léon BERNARD*
Professeur à la Faculté de Médecine de l'Université de Paris.

PAR MM.

LÉON BERNARD, GOUGEROT, HALBRON, S. I. DE JONG, LAEDERICH, LORTAT-JACOB, SALOMON, SÉZARY, VITRY

2e Edition (1920). 1 *vol. de* 867 *p.*, 337 *fig. et* 4 *pl. en coul.* **50** fr.

P. RUDAUX
Accoucheur de la maternité de l'hôpital Boucicaut.

Précis d'Anatomie, de Physiologie et de Pathologie élémentaires

5e **Édition** (1925). 1 *vol.* . . . . *Sous presse*

COLLECTION DU MÉDECIN PRATICIEN

L'OBJET de cette collection : Dire au médecin traitant tout ce qu'il doit savoir d'une spécialité, lui indiquer les méthodes les meilleures de diagnostic et de traitement — les lui décrire avec des détails assez minutieux pour lui permettre de les appliquer sans mécompte et le conduire ainsi jusqu'au seuil qu'il ne peut dépasser par ses propres moyens ; — lui permettre d'autre part de guider le spécialiste dont il recherchera le concours et auquel il doit apporter un diagnostic précis ; lui apprendre, enfin à utiliser pour le traitement tous les renseignements que la consultation, le laboratoire ou l'opération lui auront fournis.

Dr GUY-LAROCHE

Examens de Laboratoire du Médecin praticien

2e Édition (1921). 1 *vol.* 415 *pag.*, 117 *fig. et* 1 *pl. en coul.* **22** fr.

Dr Pierre RÉAL

Stomatologie du Médecin praticien

2e Édition (1921). 1 *volume de* 290 *pages avec* 169 *fig.* **15** fr.

Paul SOLLIER — Paul COURBON

Pratique sémiologique des Maladies mentales

Guide de l'Etudiant et du Praticien

(1924). 1 *volume de* 458 *pages avec* 87 *figures* . . . . **20** fr.

G. LAURENS

Oto-Rhino-Laryngologie du Médecin praticien

4e Édition, 1 *vol. in-8 de 480 p. avec 592 g. rel. cart. souple.* **22 fr**

Gaston LYON

Consultations pour les Maladies des Voies digestives

(1920). 1 *volume de 360 pages, relié carton souple . .* **16 fr.**

FLORAND et GIRAULT

Diagnostic et Traitement des affections du tube digestif

(1922). 1 *volume de 412 pages 62 figures. . . . .* **18 fr.**

Dr Alb. TERSON

Ophtalmologie du Médecin praticien

2e Édition (1920). 1 *volume de 550 pages avec 356 figures et 1 planche en couleurs . . . .* **26 fr.**

M. DIDE et P. GUIRAUD

Psychiatrie du Médecin praticien

(1922). 1 *volume de 416 pages avec planches hors texte.* **20 fr.**

COLLECTION
« MÉDECINE ET CHIRURGIE PRATIQUES »

P. GUIBAL (de Béziers)
Ex-interne des hôpitaux de Paris.

Traitement Chirurgical de la Dilatation Bronchique

(1924). 1 *volume de* 174 *pages avec* 31 *figures* . . . . . **10** fr.

H. MONDOR
Chirurgien des hôpitaux de Paris.

G. LAURET
Ancien interne des hôpitaux de Paris.

Les Ulcères perforés de l'Estomac et du Duodénum

(1923). 1 *volume de* 186 *pages avec* 14 *figures* . . . . . **10** fr.

P. MOURE
Chirurgien des hôpitaux de Paris.

Chirurgie vasculaire Conservatrice

(1923). 1 *volume de* 144 *pages avec* 110 *figures* . . . . **12** fr.

COLLECTION
« MÉDECINE ET CHIRURGIE PRATIQUES »

M. CHIRAY
Professeur agrégé
à la Facul de Médecine.

J. LEBON
Interne
des hôpitaux de Paris.

Le Tubage Duodénal

Ses applications cliniques

(1924). 1 *vol. de* 218 *pages avec* 24 *fig. et* 2 *pl. en coul.* **12** fr.

Dr Léon MEUNIER

L'État dyspeptique

(1923). 1 *volume de* 126 *pages avec* 44 *figures* . . . . . **8** fr.

Iser SOLOMON

La Radiothérapie profonde

(1923). 1 *volume de* 152 *pages avec* 42 *figures*. . . . . . **9** fr.

Paul RAVAUT

Syphilis, Paludisme, Amibiase

Le traitement d'attaque et les traitements secondaires

2e Édition (1922). 1 *volume de* 224 *pages*. . . . . **9** fr.

Louis TIMBAL
Ancien chef de clinique médicale.
Préparateur à la Faculté de Médecine de l'Université de Toulouse.

Les diarrhées chroniques

Étude clinique, coprologique et thérapeutique

(1922). 1 *volume de* 270 *pages avec figures* . . . . **12** fr.

R. GOIFFON

Manuel de Coprologie Clinique

(1921). 1 *vol. de* 232 *pages*, 36 *fig.*, 2 *pl. en couleurs* . **12** fr.

M. LOEPER
Médecin de l'hôpital Tenon.

Leçons de Pathologie digestive

(CINQUIÈME SÉRIE)

(1922). 1 *volume de* 348 *pages avec* 53 *figures* . . . . . **15** fr.

Jean GUISEZ

Diagnostic et Traitement des Rétrécissements de l'Œsophage et de la Trachée

1923). 1 *volume de* 360 *pages avec* 216 *figures et* 2 *planches en couleurs* . . . . **30** fr.

Noël FIESSINGER

Les Ferments des Leucocytes

en physiologie, pathologie et thérapeutiques générales

(1923). 1 *volume de* 238 *pages* . . . . 16 fr.

Dr VEYRIÈRES *R. HUERRE*

Traitement externe des Dermatoses

Notes de thérapeutique et de matière médicale

(1924). 1 *volume de* 236 *pages* . . . . 12 fr.

R. SABOURAUD

Entretiens Dermatologiques

à l'école Lailler (Hôpital Saint-Louis)

SÉRIE NOUVELLE. — PREMIER VOLUME

(1923). 1 *volume de* 336 *pages avec* 23 *figures* . . . . . *Épuisé.*

DEUXIÈME VOLUME

Maladies du Cuir chevelu

(1924). 1 *volume de* 272 *pages avec figures* . . . . 20 fr.

A. B. MARFAN

Professeur à la Faculté de médecine de Paris,
Médecin de l'hôpital des Enfants Malades,
Membre de l'Académie de Médecine.

Traité de l'Allaitement et de l'Alimentation des Enfants du premier âge

3e Édition (1920). 1 *vol. in*-8 *de* 926 *pages avec* 21 *figures*. **45 fr.**

A. B. MARFAN

Les Affections des Voies digestives dans la première Enfance

(1923). 1 *vol. de* 702 *pages avec* 39 *figures et* 2 *planches* **35 fr.**

Eugène TERRIEN

Ancien chef de clinique infantile
de la Faculté à l'hôpital des Enfants Malades.

Précis d'alimentation des nourrissons

4e Édition (1921). 1 *volume in*-8 *de* 309 *pages* . . . . . **12 fr.**

Précis d'alimentation des jeunes enfants du sevrage à 10 ans

(1921) 1 *volume in*-8 *de* 465 *pages*. . . . . **14 fr.**

F. de LAPERSONNE — A. CANTONNET

Manuel de Neurologie oculaire

2e Édition (1923). 1 *vol. de* 416 *p. avec* 113 *fig. et* 4 *pl. en coul.* **20** fr.

André THOMAS

Médecin de l'Hôpital Saint-Joseph.

Le Réflexe Pilo-Moteur

Étude Anatomo-Clinique sur le Système Sympathique

(1921). 1 *volume de* 242 *pages avec* 79 *fig. et* 12 *planches.* **25** fr.

Questions Neurologiques d'actualité

Vingt conférences faites à la Faculté de Médecine de Paris sous la direction de M. le Professeur PIERRE MARIE

1922). 1 *volume de* 552 *pages avec* 142 *figures* . . . . **28** fr.

BALTHAZARD, CESTAN, CLAUDE, MACAIGNE, NICOLAS, VERGER

PRÉCIS DE PATHOLOGIE INTERNE — TOME V

Système Nerveux, Par MM. CESTAN et VERGER

4e Édition (1920). 1 *vol. de* 916 *p. avec* 113 *figures. Cart.* **28** fr.

V. WALLICH

Professeur agrégé à la Faculté de Paris.

Eléments d'Obstétrique

4e **Édition** (1921). 1 *volume de* 710 *pages avec* 180 *figures.* **26** fr.

H. VARNIER

Professeur à la Faculté. Accoucheur des hôpitaux.

La Pratique des Accouchements

Obstétrique journalière

(1900). 1 *volume de* 440 *pages avec* 386 *figures, relié* . . **35** fr.

L. H. FARABEUF — Henri VARNIER

Introduction à l'étude clinique et à la pratique Des Accouchements

5e **Édition** (1922). 1 *vol. de* 488 *pages avec* 375 *figures.* **30** fr.

H. VIGNES

Accoucheur des Hôpitaux de Paris.

Physiologie Obstétricale Normale et Pathologique

(1923). 1 *volume de* 456 *pages, avec figures.* . . . . . . **22** fr.

OUVRAGES DE H. HARTMANN

Professeur de clinique chirurgicale à la Faculté de Paris.
Membre de l'Académie de Médecine.

Gynécologie opératoire

(1900). 1 *volume grand in-8 de 500 pages avec 422 figures dont 80 en couleurs, broché* . . . . **22 fr.**

Chirurgie des Organes génito-urinaires de l'homme

(1904). 1 *volume grand in-8 de 432 pages avec 412 figures.* **20 fr.**

Travaux de Chirurgie anatomo-clinique

Avec la collaboration de : MM. Boppe, Cunéo, Delamare, Esmonet, Hautefort, Henry, Küss, Lavenant, Lebreton, Lecène, Okinczyc, Petit-Dutaillis, Renaud, Ulrich, Virenque.

1re, 3e Séries. . . . . *Épuisées*

2e Série. **Voies urinaires. Testicules** . . . . **16 fr. 50**

4e Série. **Chirurgie des voies urinaires** (1913) . . . . **17 fr. 50**

5e Série. **Chirurgie des voies biliaires** (*vient de paraître*).

(1923). 1 *volume de 400 pages avec 89 figures* . . . . . . **30 fr.**

COUVELAIRE

Professeur de Clinique obstétricale à la Faculté de Paris.

Introduction à la Chirurgie utérine obstétricale

(1913). 1 *vol. de 224 pages avec 44 planches hors texte, cart.* **50 fr.**

Félix LEJARS

Traité de Chirurgie d'urgence

8e Édition (1921). 1 *volume de* 1120 *pages avec* 1100 *figures et* 20 *planches en deux tons.*

Broché, sous couverture forte . . . . 75 fr.

Relié toile, en deux volumes . . . . 90 fr.

Professeur Thomas JONNESCO

Le Sympathique
Cervico-thoracique

(1923). 1 *volume in-4° de* 92 *pages avec* 34 *figures et* 10 *planches inédites en noir et en couleurs* . . . . 40 fr.

P. ARDIN-DELTEIL
Professeur de clinique médicale
à la Faculté de Médecine d'Alger.

P. SOUBEYRAN
Professeur agrégé à la Faculté
de Médecine de Montpellier.

Manuel de Petite Chirurgie
et de Technique médicale Journalière

3e Édition (1923). 1 *vol.* 928 *de p. avec* 507 *fig. dans le texte.* 45 fr

---

Th. TUFFIER
Professeur agrégé
à la Faculté de Médecine de Paris.

P. DESFOSSES
Chirurgien
de l'hôpital Britannique à Paris.

Petite Chirurgie pratique

6e Édition (1921). 1 *volume de* 732 *pages* 425 *figures* . 32 fr.

P. POIRIER — A. CHARPY

Traité d'Anatomie Humaine

Nouvelle Édition entièrement refondue sous la direction de

A. NICOLAS

Professeur d'Anatomie à la Faculté de Médecine de Paris.

TOME I. — **Embryologie. Ostéologie. Arthrologie** *Épuisé.*

TOME II. — 1er Fasc. : **Système musculaire** *Épuisé.*

2e Fasc. : **Angéiologie** (Cœur et Artères), 248 *fig.* (3 *éd.*) *Épuisé.*

3e Fasc. : **Angéiologie** (Capillaires, Veines), (4 *édition* 1920) **22** fr.

4e Fasc. : **Les Lymphatiques**, 126 *figures* (2 *édition*) *Épuisé.*

TOME III. — 1er et 2e Fasc. : **Système nerveux central** (3e *édition* 1921) . . . . **75** fr.

3e Fasc. : **Système nerveux périphérique** . . (*en préparation*)

TOME IV. — 1er Fasc. : **Tube digestif**, 213 *fig* (3e *édit.* 1914) **20** fr.

2e Fasc. : **Appareil respiratoire**, 121 *figures* (2e *édit.*) *Épuisé.*

3e Fasc. : **Annexes du tube digestif. Péritoine** (3e *éd.* 1912). **28** fr.

TOME V. — 1er Fasc. : **Organes génito-urinaires**, 348 *fig.* (3e *édition* 1923) . . . . **65** fr.

2e Fasc. : **Organes des sens** (3e *édition* 1912) **45** fr.

Georges GÉRARD

Professeur d'Anatomie à l'Université de Lille.

Manuel d'Anatomie Humaine

2e Edition (1921). 1 *volume de* 1275 *pages avec* 1025 *figures en noir et en couleurs et* 4 *planches en couleurs* . . **75** fr.

Précis de Technique Opératoire

PAR LES PROSECTEURS DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

7 volumes petit in-8 avec de nombreuses figures

Chaque volume broché. **12** fr. — *Cartonné.* . . . **15** fr.

Abdomen, par M. GUIBÉ. *5e Édition* (1920), 242 *figures.*

NOUVELLE SÉRIE

Appareil génital de la femme, par R. PROUST et le Dr CHARRIER, prosecteur à la Faculté de médecine de Paris. *5e Edition* (1922).

Membre inférieur, par GEORGES LABEY et le Dr J. LEVEUF, prosecteur à la Faculté de médecine de Paris, *5e Edition* (1923).

Tête et cou, par CH. LENORMANT et P. BROCQ, prosecteur à la Faculté de médecine de Paris, 247 *fig.* *6e Edition* (1923).

Appareil urinaire et appareil génit. de l'homme, par Pierre DUVAL et le Dr GATELLIER, prosecteur à la Faculté de médecine de Paris. *6e Edition* (1923).

Pratique courante et Chirurgie d'urgence, par V. VEAU, et le Dr D'ALLAINES, prosecteur à la Faculté de médecine de Paris. *7e Edition* (1924).

Thorax et membre supérieur, par A. SCHWARTZ, et le Dr METIVET, prosecteur de la Faculté de médecine de Paris. *7e Edition* (1924).

L. H. FARABEUF

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris.

Précis de Manuel Opératoire

Nouvelle Édition (1924). 1 *volume in-8 de* 1092 *pages avec* 862 *figures* . . . . **30** fr.




ET
M
C
IE